

SIMONE OLIVEIRA DE CASTRO

**Perfil laboratorial hematológico, bioquímico e
anatomopatológico de cães da raça Beagle**

São Paulo

2012

SIMONE OLIVEIRA DE CASTRO

**Perfil laboratorial hematológico, bioquímico e
anatomopatológico de cães da raça Beagle**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

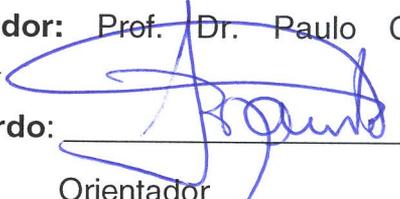
Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Maiorka

De acordo:


Orientador

São Paulo

2012

Obs: A versão original se encontra disponível na biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2623
FMVZ

Castro, Simone Oliveira de
Perfil laboratorial hematológico, bioquímico e anatomopatológico de
cães da raça Beagle / Simone Oliveira de Castro. -- 2012.
88 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo,
2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

1. Toxicologia. Cão. Farmacologia. Estudos pré-clínicos. I. Título.



Comissão de Ética no uso de animais

PARECER

Interessado: **Simone Oliveira de Castro**

Assunto: **Protocolo de experimentação adotado em experimento animal**

A Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo analisou o projeto intitulado: "Perfil Laboratorial Hematológico, Bioquímico e Anatomopatológico de cães da raça Beagle", protocolado sob o número 2657/2012, utilizando 38 (trinta e oito) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Maiorka, e constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de ética adotados por esta Comissão.

The "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo has analyzed the research entitled: "Profile Laboratory Haematology, Biochemistry and Pathology of Beagle dogs", protocol number 2657/2012, utilizing 38 (thirty eight) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Paulo César Maiorka, and found that it was conducted in accordance with the principles of ethics adopted by the committee.

São Paulo, 17 de maio de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni

Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CASTRO, Simone Oliveira de

Título: Perfil laboratorial hematológico, bioquímico e anatomopatológico de cães da raça Beagle

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Esta dissertação é dedicada a todos os animais, em especial aos cães que se sacrificaram involuntariamente em laboratórios e desta forma contribuíram também para a realização deste trabalho.

“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência”

(Augusto Cury)

*“Bem-aventurados aqueles que sabem
E cuja sabedoria está isenta de enganos e superstições.*

*Bem-aventurados aqueles que transmitem o que sabem
De forma amável, sincera e verdadeira.*

*Bem-aventurados aqueles que ganham a vida
Sem prejudicar ou por em perigo a vida de qualquer ser vivo.*

*Bem-aventurados os pacíficos,
que se despem da má vontade, do orgulho e da vaidade,
Em seu lugar, situam o amor, a piedade e a compaixão.*

*Bem-aventurados, sem limites, aqueles que, por estes meios,
Se encontram livres da limitação do egoísmo.*

*E, finalmente,
Bem-aventurados aqueles que desfrutam prazer na contemplação
Do que é profundo e realmente verdadeiro neste mundo e na nossa
vida.”*

Oração budista.

RESUMO

CASTRO, S. O. **Perfil laboratorial hematológico, bioquímico e anatomopatológico de cães da raça Beagle.** [Hematological, biochemical and anatomopathological laboratory profile of Beagle dogs]. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O objetivo desse trabalho foi analisar os dados de hematologia, bioquímica e anatomopatologia de cães do grupo controle utilizado em estudos toxicológicos, e promover a discussão sobre a necessidade de cães padronizados para testes em toxicologia, e paralelamente oferecer dados de referência para toxicologistas e pesquisadores. Utilizou-se 38 cães Beagle, sendo 19 machos e 19 fêmeas, com idades entre 4 e 14 meses no período de outubro de 2009 a novembro de 2011, do Laboratório de Análises Clínicas e Patologia do Instituto de Educação para Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico Royal. Todos os dados analisados neste estudo foram provenientes de cães criados no próprio Instituto. Foi realizada tabulação dos dados obtidos para cálculos de média, desvio padrão, valor máximo e mínimo de cada determinação. Os resultados hematológicos, bioquímicos e peso de órgãos corroboraram com os valores de referência encontrados na literatura. Os achados anatomopatológicos macroscópicos e microscópicos dos cães definiram um padrão de dados fornecendo importantes informações para análises comparativas em estudos toxicológicos e em toda área de biociências. Cães criados em biotérios sob os princípios de BPL (Boas Práticas de Laboratório), sob normas que seguem as leis brasileiras, como por exemplo, Lei Arouca (Lei 11.764) e padrões sugeridos por órgãos internacionais de bem-estar animal, como AAALAC – Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, poderão fornecer resultados mais confiáveis para testes toxicológicos, com melhor custo benefício.

Palavras-chaves: Toxicologia. Cão. Farmacologia. Estudos pré-clínicos. Beagle.

ABSTRACT

CASTRO, S. O. **Hematological, biochemical and anatomopathological laboratory profile of Beagle dogs.** [Perfil Laboratorial Hematológico, Bioquímico e Anatomopatológico de Cães da Raça Beagle]. 2012. 88 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The objectives of this study were to analyze hematological, biochemical and anatomopathological data from dogs of a control group used in toxicological studies, and to discuss the need for standardized dogs to be used in toxicological research. In parallel, we provide reference data for toxicologists and researchers. A total of 38 Beagle dogs (19 males and 19 females) were analyzed from October 2009 to November 2011. Animals were between 4 and 14 months of age, and came from the Laboratory of Clinical Analyses and Pathology of the Royal Institute in Education for Research and Technological Development [*Laboratório de Análises Clínicas e Patologia do Instituto de Educação para Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico Royal*]. All data analyzed in this study came from dogs raised in the Institute. Means, standard deviations, and maximum and minimum values were determined for each analysis. Results of hematological and biochemical tests, and weight of the organs corroborated values reported in the literature. Macroscopic and microscopic anatomopathological findings defined a data pattern that provided important information for comparative analyses of toxicological studies, and for the whole field of biosciences. Dogs raised in laboratory animal facilities using Good Laboratory Practices, in conditions that comply with Brazilian regulations, such as Lei Arouca (Regulation number 11764), and standards suggested by international animal welfare associations, such as the AAALAC – Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care - may provide more reliable results for toxicological tests, at a better cost-benefit ratio.

Keywords: Toxicology. Dog. Pharmacology. Preclinical studies. Beagle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Processo de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos.....	20
Quadro 2 – Principais órgãos avaliados em estudos toxicológicos.....	31
Figura 1 – Evolução da tercerização de serviços no Brasil.....	23
Figura 2 – Área de exercício <i>indoor</i> – enriquecimento ambiental.....	34
Figura 3 - Área de exercício <i>indoor</i> – contato visual com tratadores e entre os cães.....	34
Figura 4 – Treinamento de contenção.....	35
Figura 5 – Treinamento de contenção de coleta de sangue.....	35
Figura 6 – Área de exercício <i>outdoor</i> – interação do tratador com os cães.....	36
Figura 7 – Área de exercícios <i>outdoor</i> – enriquecimento ambiental com ossos comestíveis.....	36
Figura 8 – Área de exercício <i>outdoor</i> das matrizes prenhes.....	36
Figura 9 – Relatório de análise de ração anexada a cada estudo.....	37
Figura 10 – Relatório de análise microbiológica da água.....	38
Figura 11 – Selo de Acreditação do Instituto Royal pelo Inmetro – Unidade São Paulo.....	41
Figura 12 – Aparelho histotécnico.....	44
Figura 13 – Central de inclusão, micrótomo, placa refrigerada e banho histológico..	44
Figura 14 – Corador de lâminas automático.....	44
Figura 15 – Pneumonia Intersticial crônica. Objetiva de 4x. Coloração H.E.	50
Figura 16 a e b - Enterite catarral crônica com hiperplasia das placas de peyer. Objetiva de 4x. Coloração H.E.	50

Figura 17 - Corpúsculo de psamomas. Objetiva de 10x. Coloração H.E.	51
Figura 18 - Degeneração Hidrópica. Objetiva de 10x. Coloração H.E.....	51
Figura 19 - Microcisto cortical renal.....	52
Figura 20 Nefrite Intersticial Crônica. Objetiva de 4x. Coloração H.E.	52
Figura 21 Nefrite Intersticial Crônica. Objetiva de 10x. Coloração H.E.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores da série eritrocitária.....	46
Tabela 2 - Valores da série leucocitária.....	46
Tabela 3 - Valores plaquetários.....	46
Tabela 4 – Valores do perfil hepático.....	47
Tabela 5 – Valores do perfil renal.....	47
Tabela 6 - Valores do perfil proteico.....	47
Tabela 7 - Valores do perfil lipídico.....	48
Tabela 8 - Valores do perfil iônico.....	48
Tabela 9 - Valores do perfil glicêmico.....	48
Tabela 10 – Achados Anatomopatológicos parte I.....	49
Tabela 11 - Achados Anatomopatológicos parte II.....	51
Tabela 12 – Peso de órgãos de Machos e Fêmeas.....	53
Tabela 13 – Peso de órgãos do Sistema Reprodutivo de machos e fêmeas.....	53
Tabela 14 – Comparação dos parâmetros hematológicos – série eritrocitária.....	54
Tabela 15 – Comparação dos parâmetros hematológicos – série leucocitária.....	54
Tabela 16 – Comparação dos parâmetros hematológicos – série plaquetária.....	55
Tabela 17 – Comparação dos parâmetros bioquímicos – perfil hepático.....	55

Tabela 18 – Comparação dos parâmetros bioquímicos – perfil renal.....	55
Tabela 19 – Comparação dos parâmetros bioquímicos – perfil protéico.....	55
Tabela 20 – Comparação dos parâmetros bioquímicos – perfil lipídico.....	55
Tabela 21 – Comparação dos parâmetros bioquímicos – perfil iônico.....	56
Tabela 22 – Comparação dos parâmetros bioquímicos – perfil glicêmico.....	56
Tabela 23 – Comparação do peso de órgãos de machos e fêmeas.....	57
Tabela 24 – Comparação do peso de órgãos do sistema reprodutivo de machos e fêmeas.....	57
Tabela 25 – Valores Hematológicos para o cão Beagle.....	73
Tabela 26 – Valores Bioquímicos para o cão Beagle.....	73
Tabela 27 – Alterações anatomopatológicas em cães saudáveis da raça Beagle...	74
Tabela 28 – Valor do peso de órgão de cães machos para raça Beagle.....	75
Tabela 29 - Valor do peso de órgão de cães fêmeas para raça Beagle.....	75

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Panorama da indústria farmacêutica e dos estudos pré-clínicos no Brasil e no mundo	19
2.2 Cães como modelo experimental	23
2.3 Importância da avaliação laboratorial: hematologia e bioquímica	26
2.4 Importância da avaliação anatomopatológica	30
3 MATERIAL E MÉTODO	33
3.1 Animais	33
3.2 Estrutura do biotério	33
3.2.1 Controle Ambiental	34
3.2.2 Socialização e enriquecimento ambiental	34
3.2.3 Manejo alimentar	37
3.2.4 Manejo sanitário	38
3.3 Controle da saúde animal	39
3.3.1 Avaliação clínica	39
3.3.2 Avaliação laboratorial	40
3.3.3 Controle de qualidade	41
3.4 Colheita de amostras para o laboratório de análises clínica	41
3.5 Eutanásia	42
3.6 Avaliação Anatomopatológica	42
3.6.1 Necrópsia	42

3.6.2	Avaliação macroscópica e microscópica de órgãos.....	43
4	RESULTADOS	45
5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÃO	72
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
	REFERÊNCIAS	77

INTRODUÇÃO

Os cães da raça Beagle são conhecidos no mundo científico como modelo experimental e estão envolvidos em inúmeras publicações, rotineiramente utilizados por escolas de medicina e laboratórios, e também comumente utilizados em estudos de toxicidade para testar a segurança humana de drogas, aditivos alimentares, produtos químicos industriais e outros produtos (BATE, 1997). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) exige que estes estudos sigam normas internacionais como FDA (Food and Drug Administration), EMEA (European Medicines Agency) e da OCDE (Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento), em Boas Práticas de Laboratório (GLP) de conformidade (ANVISA, 2010). Todas as pesquisas com cães são frequentemente direcionadas ao benefício humano, mas não se pode esquecer que também traz benefícios à própria espécie quando vemos o avanço no desenvolvimento de vacinas virais, como exemplo, contra a Parvovirose, ou novas drogas para tratamento parasitário, melhorando assim a vida e sobrevivência da espécie (ILAR, 1994).

Os princípios GLP são aplicados às instalações de teste que realizam estudos exigidos por órgãos reguladores para o registro de produtos agrotóxicos, farmacêuticos, aditivos de alimentos e rações, cosméticos, veterinários, produtos químicos industriais, organismos geneticamente modificados – OGM, visando avaliar o risco ambiental e à saúde humana dos mesmos. A idealização destas normas foi baseada na versão de documentos publicados pela Organization for Economic Cooperation and Development – OECD para estabelecer procedimentos e documentos normativos utilizados no reconhecimento da conformidade de instalações/unidades. Outros documentos complementam a NIT-DICLA-035, entre elas: NIT-Dicla-034; NIT-Dicla-036; NIT-Dicla-037; NIT-Dicla-038; NIT-Dicla-039; NIT-Dicla-040; NIT-Dicla-041; NIT-Dicla-043 (INMETRO, 2011). O principal objetivo da OCDE e dos princípios da GLP é garantir a geração de dados dos testes com alta qualidade e confiança, promover a rastreabilidade e reprodutibilidade do

processo e promover harmonização dos procedimentos dos testes para a aceitação mútua de dados (MAD). Em conformidade com isto, os animais devem ser saudáveis, ter peso e idade apropriados para cada experimento (BAYNE, 2003; ANVISA, 2010).

A maioria dos estudos de toxicidade necessita de avaliações hematológicas e bioquímicas (ANVISA, 2010). Os principais parâmetros de normalização promovem segurança para os resultados experimentais, e buscam reduzir o número de animais necessários para os testes (princípio dos 3R's) (RUSSEL; BURCH, 2012), bem como garantir o bem-estar animal (COMBES, 2004), como preconiza a Lei Nº 11.794 de 08 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008), que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e cria o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA responsável em formular e zelar por cumprimento de normas, credenciar instituições para criação ou utilização de animais, monitorar e avaliar técnicas alternativas ao uso de animais e manter cadastro atualizado de procedimentos e biotérios de todo país a partir das pelas Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs. Obter animais preparados exclusivamente para pesquisa é importante em relação ao bem-estar animal, bem como para auxiliar na minimização da variação interanimal, reforçando assim a qualidade dos estudos *in vivo*, envolvendo o menor número possível de animais (ILAR, 2000). Os parâmetros avaliados no pré-estudo devem fornecer subsídios comparativos para a análise, quando nos testes de toxicidade (HOTTENDORF; HIRTH, 1974).

O presente estudo objetivou avaliar os dados de exames laboratoriais bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos realizados em cães que fizeram parte de grupos-controle em estudos toxicológicos, no período de outubro de 2009 a novembro de 2011, no Laboratório Clínico do Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica - Royal. Também visou promover a discussão sobre a necessidade de cães padronizados para testes de toxicologia e oferecer dados de referência para toxicologistas e pesquisadores.

1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama da indústria farmacêutica e dos estudos clínicos e pré-clínicos no Brasil e no Mundo

A saúde desempenha papel importante como indutora do crescimento econômico e competitividade nacional formada por segmentos industriais de base química e biotecnológica (indústria farmacêutica, vacinas, hemoderivados e reagentes para diagnóstico), de base mecânica, eletrônica e de materiais (equipamentos e materiais médicos) e pelo segmento de serviços, que é responsável por 12 % da mão de obra ocupada nacional, referente a empregos diretos e indiretos da produção hospitalar, laboratorial e de serviços de diagnóstico e tratamento (FIORUZ, 2010).

A indústria farmacêutica caracteriza-se por elevado grau de internacionalização e concentração industrial por parte das dez maiores empresas que respondem por quase metade das vendas de todo mercado farmacêutico mundial. No Brasil nota-se aumento na participação referente aos medicamentos genéricos o que proporciona uma dinâmica do mercado nacional impondo novos desafios na cadeia produtiva. Um fator que reforça esta participação diz respeito ao vencimento de patentes de vários medicamentos comercializados por multinacionais farmacêuticas do mercado brasileiro, situação esta que reforça a tendência da participação da produção de medicamentos genéricos, hoje responsável por 20% da produção nacional. Portanto, vê-se forte movimento de fusões e aquisições entre empresas farmacêuticas e biotecnológicas em âmbito nacional e mundial, e nota-se crescente incentivo à pesquisa e inovação tecnológica nacional (FIOCRUZ, 2010).

Em estudos elaborados pela IMS Health em 2008, os países emergentes devem contribuir para o crescimento do mercado farmacêutico mundial em 29%, enquanto a Europa com 19% e a América do Norte com 30% (FIOCRUZ, 2010). Em 2010, o mercado farmacêutico no Brasil cresceu 33,96% e liderou o mercado farmacêutico Latino Americano com 42,5% seguido por México e Venezuela, e a

taxa de crescimento anual composta (CAGR) é previsto em 11,4% para o período de 2010-2015 (IMS, 2011).

Tendo em vista as tendências da indústria farmacêutica, faz-se necessário o fortalecimento e ampliação da capacitação tecnológica por parte de empresas farmacêutica nacionais, fortalecimento da rede de laboratórios públicos e estreitar parcerias público-privadas para a consolidação do sistema nacional de saúde brasileiro (FIOCRUZ, 2010). O processo de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos envolvem algumas etapas: pesquisa básica, testes pré-clínicos, testes-clínicos e registros (Quadro 1).

Quadro 1 - Processo de Pesquisa e Desenvolvimento de novos medicamentos

ETAPAS	DURAÇÃO (ANOS)	TESTES	OBJETIVOS	TAXA SUCESSO	CUSTO MÉDIO (USMil)
PESQUISA BÁSICA	4-5	<i>In vitro</i>	Encontrar compostos ativos, determinar alvos, testar mecanismos de ação.	Menos de 1%	80
TESTES PRÉ-CLÍNICOS	1-2	<i>In vitro</i> e <i>In vivo</i>	Determinar dosagem, segurança e eficácia.	10%	0,2 a 23
TESTES CLÍNICOS FASE I	1-2	20 a 100 voluntários sadios	Verificar segurança e dosagem.	18%	14
TESTES CLÍNICOS FASE II	1-2	100 a 500 pacientes voluntários	Avaliar eficácia, investigar efeitos colaterais.	28%	17
TESTES CLÍNICOS FASE III	2-3	1000 a 5000 pacientes voluntários	Confirmar eficácia, monitorar reações adversas.	66%	62
REGISTRO	1-2			91%	
TESTES CLÍNICOS FASE IV	Contínuo	1000 a 5000 pacientes voluntários	Verificar efeitos adversos não previstos na população		30

Fonte: Adaptado de Capanema (2009)

Nos diferentes países do mundo estabeleceram-se critérios mínimos de segurança para liberação de uma nova droga no mercado e agências reguladoras como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos e a Agência Europeia para Avaliação de Produtos Medicinais (EMA), são responsáveis pela elaboração de normas técnicas e pela avaliação das novas solicitações de uso específico, e pela fiscalização e acompanhamento do uso destes medicamentos dentro de suas indicações. Para que um novo medicamento seja liberado são exigidos inúmeros estudos que geram informações importantes para comprovar a sua segurança e eficácia do produto. Estes estudos envolvem procedimentos experimentais e devem especificar o método utilizado, os modelos celulares, teciduais ou animais utilizados, os testes

laboratoriais, bem como os dados de farmacocinética e toxicologia. Os resultados pré-clínicos devem permitir demonstrar a relevância dos achados, as possíveis aplicações terapêuticas e antever alguns dos riscos com o seu uso (GOLDIM, 2007). A Resolução CNS 01/88 de 1998 estabelece que pelo menos uma espécie de animais não-roedores (coelhos, cães ou minipigs) deve ser utilizada nos estudos toxicológicos (ANVISA, 2010).

A análise pré-clínica deve proporcionar informações que justifiquem a realização de pesquisas em seres humanos, que acontece na etapa sequencial no processo para a liberação do novo medicamento (Resolução CNS 251/97) (GOLDIM, 2007). A pesquisa clínica por definição, segundo EMEA (1997), é “qualquer investigação em seres humanos, objetivando descobrir ou verificar os efeitos farmacodinâmicos, farmacológicos, clínicos e/ou outros efeitos de produto(s) e/ou identificar reações adversas ao produto(s) em investigação, com o objetivo de averiguar sua segurança e/ou eficácia”. A pesquisa clínica no Brasil passou a ser regulamentada de forma efetiva a partir de 1996, com a publicação da Resolução n.196 do conselho Nacional de Saúde (CNS) (GOLDIM, 2007).

A toxicologia considera que toda substância química é capaz de proporcionar efeito nocivo e, por isso, pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição (dose/concentração; duração e frequência de exposição, via de exposição; propriedades físico-químicas e suscetibilidade individual). Portanto, a avaliação toxicológica pré-clínica é de grande importância no desenvolvimento de novos medicamentos para se conhecer o tipo de efeito tóxico que pode causar dano ao meio ambiente, à saúde dos animais, do ser humano e de outros seres vivos. Assim, as tragédias farmacológicas gerais são importantes a fim de evitar tragédias como em 1937, na Europa, quando centenas de pessoas morreram ou foram intoxicadas causadas pelo dietilenoglicol empregado como solvente na preparação da sulfanilamida (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). E, mais tarde, entre 1959 e 1961, o mundo constatou a ocorrência de inúmeros casos de deformações congênitas em crianças, cujas mães haviam ingerido talidomida, como antiemético, no início da gestação (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

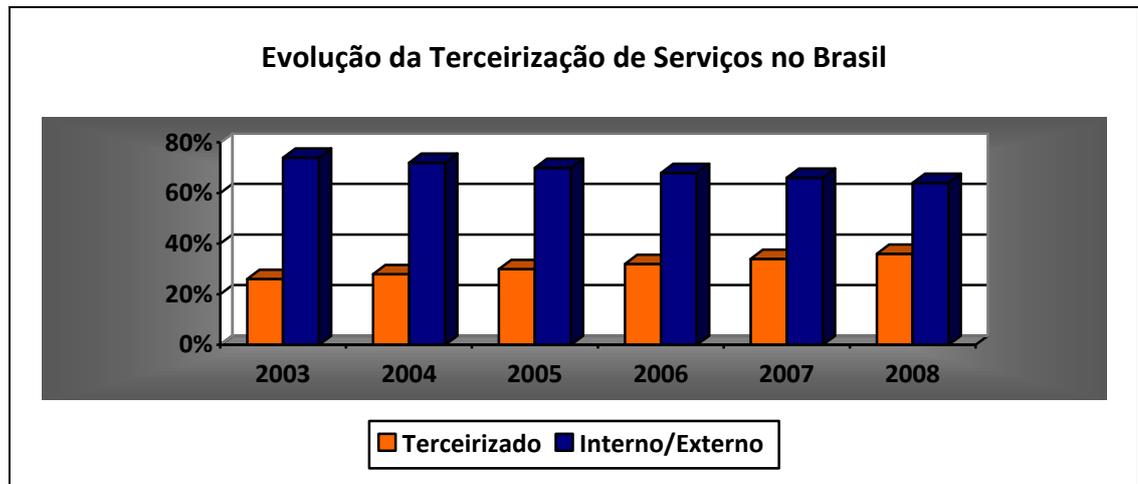
A avaliação toxicológica envolve duas categorias de ensaios. A primeira relaciona-se a ensaios delineados especificamente para avaliar os efeitos gerais da

substância química em animais de experimentação, que dirá respeito à duração ou extensão da exposição dos animais à mesma. Os principais ensaios são toxicidade aguda (única dose ou doses múltiplas em 24 horas), de doses repetidas sub-crônica (14, 21 e 28 dias) e de toxicidade crônica (90, 180 e 270 dias). Nesses estudos deverão ser utilizados modelos com pelo menos três espécies animais distintas podendo envolver machos e fêmeas (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

A segunda categoria de ensaios busca avaliar com melhores detalhes algum tipo específico de toxicidade, como por exemplo: testes teratogênicos, mutagênicos, carcinogênicos, testes reprodutivos, imunotóxicos, etc. As principais espécies envolvidas nos estudos pré-clínicos são os roedores (camundongos, ratos e hamsters), logomorfos (coelhos) e não-roedores (cães ou mini-pig) (FAGUNDES; TAHA, 2004; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008; ANVISA, 2010).

No Brasil, tradicionalmente o processo de novos medicamentos era desenvolvido internamente nas indústrias farmacêuticas, e no exterior fortemente concentrado nos EUA e Europa, com 80% do mercado. Atualmente, vemos uma tendência à terceirização a empresas prestadoras de serviços tecnológicos (CRO's) no Brasil, Leste Europeu, Índia e China, e que podem oferecer serviços de descobertas de novas drogas, execução e gerenciamento de testes pré-clínicos, execução e gerenciamento dos testes clínicos, serviços laboratoriais e preparação de documentos regulatórios (CAPANEMA, 2009). A evolução da terceirização de Serviços no Brasil segue demonstrada no figura 1.

Figura 1 - Evolução da Terceirização de Serviços no Brasil



Fonte: Adaptado de Capanema (2009)

Apesar do avanço na área de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos nas últimas décadas, o Brasil ainda enfrenta desafios de uma política industrial competitiva e sólida em nível mundial. Há outros fatores internos a superar, por exemplo, o limitado investimento no P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) no setor farmacêutico nacional, aprimorar a harmonização e conformidades dos padrões regulatórios nacionais e internacionais, superar as deficiências dos laboratórios de pesquisa nacionais na área de toxicologia, estabelecer laboratórios acreditados em GLP (Good Practice Laboratory) ou BPL (Boas Práticas de Laboratório) reconhecidos pelo Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), e estabelecer padrões internacionais nos biotérios para obtenção de credenciações internacionais. O Brasil tem estado pronto para estabelecer uma política de P&D em médio e longo prazo para atender o setor farmacêutico nacional na medida em que instituir condições necessárias para superar esses desafios (CALIXTO; JUNIOR, 2008); (ANVISA, 2010); (POLACK, 2010).

2.2 Cães como modelo experimental

Todos os cães domésticos independente da raça são *Canis Lupus Familiaris*, porém ocorrem diferenças genóticas e fenotípicas na medida em que se faz uma seleção reprodutiva genética de cada raça (ILAR, 1994). Há pelo menos 14.000

anos, o cão foi domesticado e associou-se ao homem sendo tratado como parte da família, aprendeu a conhecê-lo e respeitá-lo, e por isso quando utilizado em estudos deve haver uma justificativa especial para seu uso (HUBRECHT, 2012). A busca pela sobrevivência melhora de vida e busca da compreensão dos organismos como um todo, levou o homem a estudar os animais e perceber que assemelhavam e diferiam em muitos aspectos. Até meados do século XVII, os animais eram considerados seres não sencientes, incapazes de sentir dor, um exemplo disso foram as cirurgias experimentais de John Hunter (1760-1780), sobre a dinâmica da circulação feitas em cães e equinos. Hoje sabemos que muitas classes de animais são capazes de sentir dor, angústias e sofrimentos, e esse conhecimento é relativamente recente. Os métodos científicos experimentais evoluíram, e as primeiras legislações de proteção aos animais surgiram no Reino Unido, em 1876 chamado Cruelty to Animals Act (LIMA, 2008; LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2010).

Outro marco importante no uso de animais de laboratório aconteceu em 1959, durante uma reunião anual da Associação Americana para Ciência de Animais de Laboratório (AALAS), em que o fundador da Universities Federation for Animal Welfare (UFAW) apresentou um trabalho de dois cientistas ingleses, William Russel, zoologista e psicólogo, e Rex Burch, microbiologista, denominado “The Principles of Humane Experimental Technique”. Trabalho esse que discutiu os aspectos éticos e o progresso e desenvolvimento de técnicas humanizadas da experimentação animal, sintetizados no chamado “Princípio dos 3 R’s: *Replacement*, *Reduction* e *Refinement*”. *Replacement* ou reposição é a busca por métodos científicos alternativos de substituição ao uso de animais, sendo uma constante preocupação. Apesar de todos os avanços no desenvolvimento desses métodos, ainda existem algumas barreiras que não foram transpostas, como, por exemplo, no caso do estudo da ação de um fármaco, onde é necessário avaliar a interação entre os sistemas orgânicos em um organismo vivo, observando seus efeitos e ação tóxica, assim como em estudos que envolvem o comportamento, memória e estudos da dor. *Reduction* ou redução é a busca da capacidade de utilizar o menor número de animais, e, ao mesmo tempo, obter a informação experimental com qualidade e exatidão. Os tratamentos estatísticos e escolha adequada de espécie ou linhagem são um exemplo disso. Por último, *refinement* é a avaliação minuciosa sobre possíveis modificações nos protocolos de pesquisa visando diminuir a incidência de

medo, dor ou desconforto dos animais de laboratório para melhorar seu bem-estar. A utilização de enriquecimento ambiental, o estabelecimento de *endpoint* e método de eutanásia adequado para cada espécie melhora consideravelmente o bem-estar animal no transcorrer de uma pesquisa (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2010).

Em 1966, nos EUA a primeira lei criada objetivando regulamentar a prática de animais de laboratório adveio após movimento social em apoio a um episódio ocorrido com um proprietário de um cão da raça Dálmata. O proprietário notou que seu cão havia sumido e o encontraram em um laboratório de pesquisa. Devido a este fato, criou-se o Laboratory Animal Welfare Act, que passou por algumas revisões e hoje é chamado de Animal Welfare Act, sendo uma lei que abrange o bem-estar animal, contempla todas as categorias de animais, introduz exigências específicas para primatas não-humanos e cães, e impõe treinamento adequado para os profissionais da experimentação (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2010). Hoje em dia, diversas leis no Brasil e no mundo regulamentam a utilização de animais na pesquisa. No Brasil, a Lei 11.794, conhecida como lei Arouca (BRASIL, 2008), foi sancionada em 08 de outubro de 2008 e regulamentada em 15 de julho de 2009 através do Decreto 6.899 que efetivou a normatização sobre a criação e o uso de animais (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2010; MACHADO et al., 2010).

Todas as pesquisas com cães são frequentemente direcionadas ao benefício humano, mas não se pode esquecer que também traz benefícios à própria espécie. Através dos estudos com cães, a ciência e sociedade puderam notar o aprimoramento e evolução de diversas áreas da saúde, por exemplo, aprimoramento de técnicas diagnósticas; novos tratamentos para diabetes e artrite; aprimoramento de procedimentos cirúrgicos cardiovasculares e ortopédicos; novas terapias contra o câncer, doenças autoimunes, dentre outras. Observa-se também a contribuição para a própria espécie quando vemos o avanço no desenvolvimento de vacinas virais, como exemplo, contra a Parvovirose, ou novas drogas para tratamento parasitário, melhorando assim a vida e sobrevivência da espécie (ILAR, 1994).

Diversas raças de cães são utilizadas em estudos laboratoriais, porém nas investigações toxicológicas o cão da raça Beagle é o mais utilizado devido ao seu porte pequeno, temperamento dócil, semelhanças fisiológicas com o ser humano e capacidade de se adaptar a ambientes pequenos (TIAN et al., 2004). O cão Beagle

quando criado especificamente para fins de pesquisa oferece uma vantagem frente a demais raças por apresentar características genéticas conhecidas, controles históricos definidos de saúde e tratamentos terapêuticos estabelecidos (DERELANKO; HOLLINGER, 2002; SCHNAIDER; SOUZA, 2003; SCHAPIRO; EVERITT, 2011).

Os animais experimentais são criados em biotérios, e apesar de estarem protegidos de riscos que estariam expostos em vida livre, dependem totalmente do homem para seu bem estar. O bem-estar é a relação de um indivíduo com a tentativa de adaptar-se ao seu ambiente, e alcançá-lo, por isso é fundamental compreender os aspectos anatômicos, a etologia, manejo e fisiologia da espécie em questão antes de utilizá-la. Controlar fatores como, temperatura, ventilação, ruído e qualidade do ar, enriquecimento ambiental e manejo sanitário contribuem para melhora da qualidade de vida desses animais e evita que ocorram conclusões inválidas nos experimentos ou que aumente desnecessariamente o número de animais utilizados (POLITI et al.; 2008; CARDOSO et al., 2011).

2.3 Importância da avaliação laboratorial: hematologia e bioquímica

Os cães da raça Beagle, apesar de suas semelhanças na morfologia anatômica e fisiologia comparada com seres humanos, podem apresentar variabilidades individuais, assim como os demais animais de laboratório. Na pesquisa biomédica, é sabido que ao utilizar animais a variabilidade individual pode afetar o resultado do estudo. Por isso, ao se valer de um modelo animal deve-se ter estabelecido e conhecido os padrões físicos, comportamentais, clínicos e laboratoriais para minimizar a variabilidade e ter confiabilidade nos resultados obtidos no estudo. Ao se analisar bases de dados contendo valores químicos de sangue e urina tem se notado algumas diferenças segundo sexo, idade e condições nas quais os animais são mantidos. A obtenção de dados de base ou controles históricos dos valores químicos do sangue dos animais é uma forma de estabelecer padrões de referência para a pesquisa toxicológica e demais áreas de biociências,

vindo auxiliar no aperfeiçoamento da utilização dos animais e na redução do número de animais usados (ALÉMAN, 2000; SCHAPIRO; EVERITT, 2011).

Os valores mais utilizados nos protocolos experimentais sugeridos pelos principais órgãos regulamentadores são (OECD,1998; BUSH, 2004; ANVISA, 2010).

- Hematologia: eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, V.C.M - volume corpuscular médio; H.C.M.- hemoglobina corpuscular média; C.H.C.M - concentração de hemoglobina corpuscular média, leucócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes, segmentados, eosinófilos, basófilos, monócitos, e plaquetas.
- Bioquímica: uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina, colesterol total, triglicérides, cálcio, fósforo, glicose, sódio, potássio e cloreto.

Os exames hematológicos são considerados menos capazes de indicar a origem do problema do que os testes bioquímicos que são órgãos específicos, portanto, o conjunto de testes hematológicos serve de complemento aos achados bioquímicos (BUSH, 2004). A avaliação dos dados hematológicos em um laboratório de toxicologia implica na avaliação da qualidade dos dados. Esta tarefa diz respeito a questões de garantia de qualidade: uso desde normalização, avaliação da precisão e exatidão, procedimentos de validação, e metodologias pré-estabelecidas e conhecidas internacionalmente (BLOOM, 1993).

A fim de compreender a importância dos valores normais séricos bioquímicos de cães da raça Beagle de forma sistemática vale destacar algumas informações importantes para a avaliação clínica da pré-seleção dos cães para estudo e em experimento e, portanto, contribuir para uma melhor interpretação de dados para espécie. Poucos estudos sobre esse tema, em cães e gatos, foram realizados no Brasil (GONZÁLEZ et al., 2001).

Segundo González et al. (2001, p. 2): “[...] *A interpretação adequada do perfil bioquímico sangüíneo implica na utilização de valores de referência adaptados para as condições geográficas, de manejo, de raça, de alimentação e até do próprio laboratório que realiza as dosagens [...]*”.

Nas avaliações dos perfis séricos de bioquímica vale destacar informações pertinentes na interpretação dados neste estudo. O perfil hepático do presente estudo avalia a enzima aspartato aminotransferase (AST) que é uma enzima de extravasamento, parte dela livre no citoplasma de hepatócitos com maior concentração nas membranas das mitocôndrias, e encontra-se presente em uma ampla variedade de tecidos como células do músculo cardíaco, esquelético e fígado (GOMES et al., 2008). E, a enzima fosfatase Alcalina (FA) é uma izoenzima produzida pelas células de vários órgãos de indução sintetizada no fígado (epitélio do ducto biliar e do parênquima hepático), ossos (osteoblastos), nos epitélio intestinal, e renal e na placenta. O fígado é um órgão com diversas funções metabólicas, e qualquer avaliação do seu estado funcional será dependente da sua habilidade em executar uma função metabólica específica (GOMES et al., 2008). O fígado realiza mais de 1500 funções bioquímicas essenciais para sobrevivência do indivíduo, entre elas, metabolismo de carboidratos, lipídeos, e proteínas, sínteses das proteínas plasmáticas e fatores de coagulação; detoxificação e excreção de medicamentos, toxinas e mepesamomaabólitos; e a formação e eliminação da bile (SILVA, 2005). Em cães, a meia-vida da fosfatase alcalina intestinal, renal e placentária é de, aproximadamente seis minutos, assim, o aumento da produção e de sua atividade sérica pode ser notado principalmente em casos de maior atividade osteoblástica, colestase, indução por drogas como corticóides e fenobarbital e várias doenças crônicas, inclusive neoplasias (BUSH, 2004; GOMES et al., 2008). Destaca-se que em cães com idade inferior a seis meses, a atividade sérica da enzima pode estar aumentada em até seis vezes (BUSH, 2004). Avaliar um perfil hepático raramente é um processo simples porque não existe disponível atualmente um método que ofereça sensibilidade e especificidade perfeitas. Por isso, na avaliação da função hepato-celular, deve-se utilizar um conjunto de testes laboratoriais (KITAMURA, 2008).

No perfil renal, avalia-se a uréia e a creatinina. A uréia é sintetizada no fígado a partir da amônia, sendo que a maior parte vem do catabolismo de aminoácidos, derivados de proteínas dos tecidos ou alimentar (HENNEMANN et al., 1996; BUSH, 2004). A uréia é amplamente excretada pelos rins, cerca de metade é reabsorvida dependendo da hidratação do animal e taxa de formação de urina. Portanto, um discreto aumento de uréia no plasma não é necessariamente resultante de insuficiência renal, em que concentrações de uréia de 17 a 20mmmol e acima disso

>100 a 120mg/dL = BUN (nitrogênio sérico sanguíneo) >50 a 60mg/dL são significantes. A uréia é uma das várias substâncias não protéicas que se acumulam no plasma quando a excreção renal está diminuída (BUSH, 2004).

A creatinina plasmática deriva em grande parte dos tecidos musculares, e sua excreção se dá somente por via renal; sendo livremente filtrada e não reabsorvida. A concentração plasmática de creatinina reflete a excreção e concentrações elevadas indicam deficiência da função renal. Embora reflita a função renal de forma mais precisa que a uréia, o melhor para avaliação da função renal é a avaliação conjunta de uréia e creatinina (BUSH, 2004). Entretanto, o aumento dessas substâncias só ocorre quando cerca de 75% da função renal é perdida e, dessa maneira, avaliação de ambos parâmetros permite o reconhecimento mais precoce da doença renal, e tornam-se muito importantes para um melhor prognóstico (LANIS et al., 2008).

As alterações proteicas mostram-se importantes indicadores de doenças, independentemente da fase em que o cão se encontra, lembrando que a albumina e todas as outras proteínas, com exceção das imunoglobulinas, são sintetizadas pelo fígado. E, as anormalidades comumente vistas envolvem os processos de desidratação, inflamações, alterações hepáticas, distúrbios autoimunes entre outros (BUSH, 2004; SCHMIDT et al., 2004; SANTARÉM; JOSÉ; LAPOSY, 2008).

A mensuração dos níveis de triglicerídeos e colesterol forma a base de teste da absorção de gordura e auxilia no diagnóstico de alterações na digestão/absorção de gordura como, por exemplo, no hipotireoidismo, pancreatite aguda, hiperadrenocorticismos, danos hepáticos, diabetes entre outros (BUSH, 2004).

O perfil iônico é importante para avaliação da manutenção das funções biológicas, transmissão de impulsos nervosos, permeabilidade e excitabilidade de todas as membranas e ativação de vários sistemas enzimáticos, por exemplo, coagulação sanguínea (BUSH, 2004).

Por fim, a glicose é requerida constantemente como fonte de energia por todas as células corpóreas, por isso, é fundamental manter sua concentração adequada no plasma (BUSH, 2004).

2.4 Importância da avaliação anatomopatológica

A avaliação anatomopatológica e histopatológica de órgãos é considerada a mais importante para o controle do padrão dos animais, porque pode revelar aspectos de lesões subclínicas espontâneas na espécie ou serem indicativos de doença ou alteração tóxica pós-tratamento (HOTTENDORF; HIRTH, 1974; ALÉMAN, 2000). Exames anatomopatológicos são feitos essencialmente para caracterizar efeitos indesejáveis de produtos químicos, drogas, partículas e componentes biológicos na vida de organismos e ecossistemas, e são à base da moderna investigação toxicológica. Patologia Toxicológica busca responder as relações entre os sistemas de teste farmacológicos e toxicológicos e os efeitos dos compostos em várias doses, em diferentes vias de aplicação e por períodos variados de uso (ETTLIN et al., 2008). Em ensaios toxicológicos se faz necessário à observação dos sinais de toxicidade e se os efeitos são reversíveis ou não como, por exemplo, nos ensaios de toxicidade subaguda, subcrônica, crônica, carcinogênicos, reprodutivos e teratogênicos. Através da identificação e caracterização das lesões orgânicas encontradas após tratamento, bem como pelas alterações hematológicas e bioquímicas, obtemos informações dos efeitos tóxicos ou não daquela determinada molécula testada. Por isso, a avaliação anatomopatológica e histopatológica de todos os animais no final do estudo deve acontecer (OECD, 1998; SELLERS et al., 2007; SPINOSA, 2008; ANVISA, 2010). Os principais órgãos examinados nos estudos anatomopatológicos e histopatológicos de uma maneira geral estão relacionados no quadro 2.

Quadro 2 - Principais órgãos avaliados em estudos toxicológicos

Anatomopatológico	Histopatológico
Tiróide	Adrenais
Coração	Coração
Fígado	Fígado
Baço	Intestinos Grosso e delgado
Rins	Baço
Adrenais	Tireóide
Linfonodos	Linfonodos
Ovários	Rins
Útero	Estômago
Testículos	Pâncreas
	Bexiga Urinária
	Ovários
	Útero
	Testículos

Fonte: Adaptado de Spinosa (2008)

Os dados anatomopatológicos possuem importância fundamental para avaliação minuciosa de animais controles quando comparados aos animais tratados com alguma substância durante um ensaio toxicológico. Os principais parâmetros avaliados compreendem órgãos alvos dos principais sistemas fisiológicos do corpo: sistema linfóide, sistema hematopoiético, respiratório, digestório, sistema nervoso central, endócrino, pele e anexos (HOTTENDORF; HIRTH, 1974; MORTON et al., 2006). Os achados de patologia também devem ser integrados com outros dados do estudo para fornecer uma ampla discussão sobre a toxicidade e/ou farmacologia de um produto químico, do dispositivo, ou o material e a relação de toxicidade para exposição, entre eles: o protocolo de estudo e todas as emendas ao protocolo, sinais clínicos, o peso corporal e alimentos fornecidos, a biologia da molécula em questão (por exemplo, distribuição no tecido, e a função da molécula-alvo, se forem conhecidas), informações sobre a atividade e toxicidade conhecidas do artigo de teste, e dados farmacocinéticos (MORTON et al., 2006).

Ao longo das últimas décadas a experiência coletiva de patologistas toxicológicos ao redor do mundo vem contribuindo para confecção de processos e protocolos amplamente descritos e universalmente aceitos na tentativa de harmonizar as práticas e avaliações patológicas (MORTON et al., 2010). O futuro da patologia toxicológica é ver a evolução contínua das instituições de pesquisa e agências reguladoras de todo o mundo, aprimorar a prática da geração de dados com qualidade (MORTON et al., 2010) e melhorar a capacidade das avaliações através da utilização das boas práticas de laboratório (BPL ou GLP) (MORTON et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Os dados foram coletados de outubro de 2009 a novembro de 2011 do Laboratório de Análises Clínicas e Patologia do Instituto de Educação para Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico Royal – Instituto Royal. Foram utilizados dados gerados em estudos toxicológicos com cães do grupo controle. Coletou-se informação de 38 cães Beagle, sendo 19 machos e 19 fêmeas, com idades entre 4 e 14 meses. Todos os cães foram criados no Canil de Criação do próprio laboratório, todos apresentam padrão oficial da raça Beagle (CBKC; 2000). Foi realizada tabulação de dados obtidos para cálculos de média, desvio padrão, valor máximo e mínimo de cada determinação.

3.2 Estrutura do biotério

A estrutura da criação e experimentação de cães do Instituto Royal foi projetada com base nas recomendações sobre o uso e criação de animais de laboratório de grandes instituições norte-americanas e europeias, entre elas o FELASA - Federation of European Laboratory Animal Science Associations, AAALAC – American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care. Assim como, baseada no “Manual sobre os Cuidados e Usos de Animais de Laboratório”, publicado desde 1996, pelo Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council. Nacionalmente tem como base leis como: Lei Federal Nº 1.153-B (Lei Arouca), Lei Estadual Nº 11.977 de 25/08/2005, Decreto-Lei Estadual Nº 40.400 24/10/1995, e todos os estudos são avaliados pela comissão de ética do CEUA – POA. A estrutura física, portanto, permite o adequado controle sanitário para produção de cães com qualidade experimental internacionalmente reconhecida.

3.2.1 Controle Ambiental

O biotério estabelece um controle ambiental desde o nascimento dos cães até o final dos estudos. A temperatura ambiental da área dos cães fica em torno de 17 a 28°C e a umidade entre 35 e 75%. Quanto à luminosidade segue o ciclo de 10-12 horas, e todos os cães recebem incidência solar de no mínimo 2 horas por dia. Todos os dados gerados e fornecidos estão sob forma de registro interno do biotério definidos em protocolos descritos em POP's – procedimentos operacionais padrão – que foram estabelecidos previamente pela equipe de médicos veterinários e supervisionados pela equipe da garantia da qualidade e gerência de instalação de teste, como definem as normas de BPL – Boas Práticas de Laboratório (NIT-DICLA 035) preconizadas pelo Inmetro.

3.2.2 Socialização e Enriquecimento Ambiental

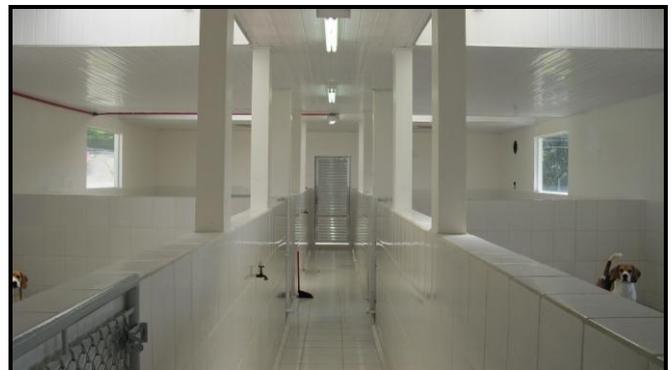
As instalações do canil promovem contato físico, auditivo e visual entre indivíduos e entre as pessoas desde filhotes, visando minimizar o estresse (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Área de exercício *indoor* - enriquecimento ambiental



Fonte: Instituto Royal (2011)

Figura 3 - Canil estoque – área de exercício indoor – contato visual com tratadores e entre os cães



Fonte: Instituto Royal (2011)

Toma-se cuidado de não permitir que fiquem sozinhos por mais de 4 horas, a menos que seja indicado para o experimento. Todos os cães produzidos no canil passam por um período de socialização intensa entre a 4ª a 20ª semana de idade e até entrarem em estudo. Os cães têm contato social com outros filhotes, cães adultos, humanos e são feitas diversas simulações de manipulação de possíveis procedimentos experimentais (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Treinamento de contenção



Fonte: Instituto Royal (2011)

Figura 5 - Treinamento de contenção para coleta de sangue



Fonte: Instituto Royal (2011)

Estabelecem-se grupos de filhotes que tenham tamanho e peso aproximado. Os recintos *indoor/outdoor* e *indoor* possuem acesso à área de exercício onde se promove interação com outros cães e com os tratadores (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Área de exercício outdoor - interação do tratador com os cães



Fonte: Instituto Royal (2009)

Figura 7 - Área de Exercício *outdoor* - enriquecimento ambiental com ossos comestíveis



Fonte: Instituto Royal (2009)

As áreas são separadas para as diferentes atividades (Figura 8). A interação dos cães com o homem facilita no momento da manipulação para realização da pesquisa.

Figura 8 - Área de exercício *outdoor* das matrizes prenhes



Fonte: Instituto Royal (2009)

3.2.3 Manejo Alimentar

Os cães recebem ração premium *ad libitum* desde o desmame e durante os estudos, a não ser que haja restrição alimentar indicada. A ração é adquirida de empresa que possui BPF – Boas Prática de Fabricação e que tenha o selo PiqPet aprovado pela ANFALPET (Associação Nacional dos Fabricantes de Produtos para Animais de Estimação) objetivando garantir o equilíbrio constante da composição da ração produzida e a qualidade do alimento oferecido. Além disso, avalia-se a presença de aflatoxina em laboratórios externos que tenham sistema de qualidade instalada e reconhecida. A frequência de avaliação é anual ou previamente a algum estudo no qual haja necessidade (Figura 9).

Figura 9 - Relatório de análise de ração

CETAL SC LTDA - Centro Tecnológico de Análise de Alimentos
 Rua Seneza Oreste Rodrigues de Aguiar, 11742 - Vila Industrial
 CEP 98770-047 - Alto dos Capões - SP - Brasil
 Telefone: (51) 4714-2001 - Fax: (51) 4714-2001
 http://www.cetal.com.br e-mail: set@vet.com.br

RELATÓRIO DE ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICO nº3555/10

Cliente: INET DE EDUCAÇÃO PARA PÊSO, DESENVOLVIMENTO E INOCUAÇÃO TEG / ROY
 Endereço: RODOVIA RAPOSO TAVARES, KM 98 S/N - MALASQUÍ
 Município: SÃO JOSE DO OESTE
 UF: RS
 CEP: 98131-200
 Fone: (51) 4714-1040
 Fone: (51) 4714-1040

Produto: RAÇÃO PARA CÃES
 Marca: BULLDOG FLYCATCHER
 Descrição: 2007/1061
 Quantidade: 20000000
 Data de emissão: 28/08/2010
 Data de validade: 28/08/2010
 Data de validade: 31/08/2010
 Data de validade: 31/08/2010

FABRICANTE: SOTRULTEC/SC

ANÁLISE	RESULTADO	ANAL PET**	MÉTODO
AFLATOXINA (B1)	Não detectado (HL G, +1.0mg/kg)		
AFLATOXINA (B2)	Não detectado (HL G, +1.0mg/kg)	Aflatoxina Total (B1+B2+G1+G2) + máx. de 10µg	Cometografia líquida de Alta eficiência
AFLATOXINA (G1)	Não detectado (HL G, +1.0mg/kg)		
AFLATOXINA (G2)	Não detectado (HL G, +1.0mg/kg)		

L.Q. = Limite de quantificação
 ** Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais
 A amostra analisada está de acordo com as especificações.
 SEU RESULTADO É RESTRITO PARA A AMOSTRA ANALISADA.

Adriana D. Silva
 Analista de Qualidade
 SOTRULTEC/SC

Fonte: Instituto Royal (2010)

A ração premium segundo ANFALPET, deve ter *análise química comprovando os níveis de ômega 3 e ômega 6 (se mencionados no pacote), comprovação da existência de nutrientes funcionais – como condroitina, por ex. (se mencionados no pacote) análises microbiológicas e Boas Práticas de Fabricação implementadas., a comprovação dos teores de ácido linoleico, comprovação da digestibilidade total (a “absorção” da ração pelo organismo do cão, por assim dizer) maior ou igual a 75%, digestibilidade da proteína bruta maior ou igual a 75%, digestibilidade do extrato*

etéreo (“gordura”, grosso modo) maior ou igual a 85%, digestibilidade dos extrativos não-nitrogenados (“carboidratos”) maior ou igual a 80%, valores de energia metabolizável obtidas *in vivo* e análise dos teores de vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D e E) (ANFALPET, 2012).

A água é oferecida *ad libitum*. Todos os cães desde o nascimento até sua utilização para estudo recebem água filtrada e realiza-se avaliação da qualidade a cada três a quatro meses, ou quando se fizer necessário (Figura 10).

Figura 10 - Relatório de análise microbiológica da água



CETAL S/C LTDA. - Centro Tecnológico de Análise de Alimentos
 Rua Tenente Orosrio Rodrigues de Aguiar, n.º 1740 - Vila Industrial
 CEP: 08770-041 - Mogi das Cruzes - SP - Brasil
 Telefone: 51 41 4099-2001 - Fax: 51 41 4099-2001
 http://www.cetal.com.br e-mail:сад@сetal.com.br



CERTIFICADO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA nº 2606/09

Instituto Cliente: INSTITUTO DE EDUCAÇÃO PARA PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA - ROYAL		Departamento nº: 1150
Endereço: RUA PROFESSOR ENÉAS DE SIQUEIRA NETO, 340 - JARDIM DAS IMBUIAS		
Município: SÃO PAULO/SP	CEP: 04829-300	
Telefone: (11) 5928-0550	Fax: (11) 5928-0550	
Produto/Item: ÁGUA - FORNEIRA COM FILTRO		
Quantidade: 03/12/2009 09:30	Tempo de Análise: 03/12/2009 13:45	Data Final: 03/12/2009 09:12/2009
Data: A amostra analisada está de acordo com os padrões microbiológicos vigentes.		

ANÁLISE	RESULTADO	Limite Máx. Permiss. (Potência nº215 - An/Reg)	MÉTODOS
Coliformes totais	<1,0UFC/100mL (est.)	<1,0UFC/100mL	MS-004 rev.01
Coliformes a 45°	<1,0UFC/100mL (est.)	<1,0UFC/100mL	MS-004 rev.01
Pseudomonas aeruginosa	<1,1NMP/100mL	<1,1NMP/100mL	MS-001 rev.01
Streptococos Fecais	<1,1NMP/100mL	<1,1NMP/100mL	MS-004 rev.01
Enterococos	<1,1NMP/100mL	<1,1NMP/100mL	MS-004 rev.01
Clostridio Sulfito Redutor	<1,1NMP/100mL	<1,1NMP/100mL	MS-005 rev.01

ESTE RESULTADO É RESTRITO PARA A AMOSTRA ANALISADA.


GERENTE DE LABORATÓRIO


RESPONSÁVEL PELA LABORATÓRIO


RG-079 rev.02 1/1

Fonte: Instituto Royal (2010)

3.2.4 Manejo Sanitário

O manejo sanitário acontece diariamente no qual se efetua a limpeza e desinfecção baseados em procedimentos operacionais padrão pré-estabelecidos e aprovados pela equipe de médicos veterinários, garantia da qualidade e gerência.

Para realização da limpeza e desinfecção, os cães são retirados das baias e, ao término, os cães retornam ao local. As excretas e os materiais sólidos são removidos de todas as áreas usadas pelos cães diariamente e diversas vezes ao dia. O programa de limpeza e desinfecção foi adaptado ao canil com base no regulamento de limpeza e desinfecção do Ministério da Saúde portaria nº 113, de 22 de novembro de 1993, no qual sugere forma de limpeza de material orgânico e os principais produtos de ação desinfetante, e no Manual de Biossegurança da Organização Mundial da Saúde (2004). O manejo sanitário bem estabelecido e otimizado proporciona equilíbrio microbiológico ambiental e, conseqüentemente, manutenção da saúde dos cães.

3.3 Controle da Saúde Animal

O controle da saúde animal envolve principalmente a avaliação clínica, a avaliação laboratorial e controle de qualidade que fornece apoio para manutenção estabelecida.

3.3.1 Avaliação Clínica

Os cães do Instituto Royal passam por seleção genética compatível ao padrão da raça Beagle. Todos os cães são submetidos a controle periódico que inclui avaliações clínicas diárias e semanais. É realizada avaliação trimestral, ou quando necessário, por meio de exames hematológicos, bioquímicos e coproparasitológico; anualmente realiza-se pesquisa de partículas virais em microscopia eletrônica para as principais doenças como Parvovirose, Cinomose, Leptospirose e Coronavirose. São realizadas imunizações contra as principais doenças de cães como a cinomose, hepatite contagiosa, adenovirose, parvovirose, parainfluenza, leptospirose e coronavirose; promove-se controle de endoparasitos através de vermifugações

periódicas e avaliações coproparasitológicas, e de ectoparasitos através de banhos e produtos comerciais específicos.

Todos os cães que entram em estudo passam por uma pré-seleção clínica e laboratorial. A cada estudo, são fornecidos pelo médico veterinário responsável pela criação os exames individuais hematológicos, bioquímicos e vermifugação com prazo mínimo de trinta dias, além de ficha completa contendo a última avaliação clínica, número do microchip, vacinações, peso, sexagem e demais observações que sejam pertinentes.

3.3.2 Avaliação Laboratorial

O laboratório clínico fornece dados descritivos importantes ao Canil Experimental, para avaliação específica e individual proporcionando apoio técnico à seleção de cães saudáveis. A colheita do material biológico segue POP de colheita de amostras e os recipientes de armazenamento são identificados com o microchip ou o código do sistema-teste (cão) e/ou número do estudo, se pertinente. O laboratório de análises clínicas conta com equipamentos modernos de análise hematológica e bioquímica como o Analisador Bioquímico COBAS C111 Analyser – Roche Diagnósticos e o Analisador Hematológico POCH-100IV DIFF – Roche Diagnósticos que periodicamente são monitorados pelo sistema de garantia de qualidade e passam por testes de qualidade para garantia da emissão dos dados gerados.

Os principais parâmetros avaliados são

- Hematologia: Glóbulos Vermelhos (V.C.M.; H.C.M.; C.H.C.M.; Leucócitos), Glóbulos Brancos (Bastonetes; Segmentados; Eosinófilos; Linfócitos; Monócitos); Plaquetas; Tempo de Protrombina; T.T.P.A.;
- Bioquímica: Albumina; Cálcio; Cloretos; Colesterol Total; Creatinina; Fósforo; Glicose; Potássio; Proteínas Totais; Sódio; ALT; Triglicérides; Uréia.

Todos estes exames são exigidos na maioria dos protocolos dos estudos toxicológicos descritos e exigidos pela ANVISA (2010) e protocolos OECD, como por exemplo, o protocolo OECD 409 - Toxicidade oral em doses repetidas (90dias).

3.3.3 Controle de Qualidade

O Instituto Royal é acreditado e supervisionado pelo Inmetro - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, órgão que regulamenta os estudos em toxicologia no Brasil (Figura 11) através da NIT-DICLA 035, que estabelece os requisitos a serem utilizados pelas instalações de teste para o reconhecimento da conformidade destas instalações aos Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL).

Figura 11 - Selo de Acreditação do Instituto Royal pelo Inmetro – Unidade São Paulo



Fonte: Instituto Royal (2011)

3.4 Colheita de Amostras para o Laboratório de Análises Clínicas

A colheita de amostras para o laboratório de análises clínicas foi realizada na sala de procedimento do canil. O ambiente era tranquilo e longe de outros animais. A colheita de sangue é feita por punção jugular após contenção física e antissepsia. Todas as colheitas foram executadas à vácuo. A homogeneização imediata ocorreu manualmente e cuidadosamente através do método de inversão. Repetiu-se o procedimento nos tubos restantes avaliando quais parâmetros seriam realizados de acordo com o plano de estudo e/ou orientação dos colaboradores do laboratório de análises clínicas, empregando os tubos contendo os anticoagulantes adequados para cada avaliação. Os tubos com tampa azul, contendo anticoagulante citrato

foram utilizados na colheita de sangue para realização de exames de coagulação; tubos com tampa vermelha, sem anticoagulante (seco) foram utilizados na colheita de sangue para realização de exames bioquímicos; tubos com tampa roxa, contendo anticoagulante EDTA foram utilizados na colheita de sangue para realização de hemograma, e tubos com tampa cinza, contendo anticoagulante fluoreto foram utilizados na colheita de sangue para realização exames de glicose. As amostras foram transportadas para o laboratório e processadas imediatamente.

3.5 Eutanásia

A eutanásia dos cães aconteceram ao final do ensaio seguindo-se os requisitos para o bem-estar animal em ambiente separado dos demais. Após a contenção, foi aplicado Tiopentax® - Laboratório Cristália na dose mínima de 25mg/kg, por via intravenosa até atingir o plano anestésico profundo, e em seguida aplicou-se uma ampola contendo cloreto de potássio a 10% para a eutanásia. O óbito foi confirmado observando-se parada respiratória, parada cardíaca através da auscultação e dilatação da pupilar. Os animais foram então identificados e encaminhados ao laboratório de patologia.

3.6 Avaliação Anatomopatológica

Na avaliação anatomopatológica foi feita a necrópsia e, sequencialmente a avaliação macroscópica e microscópica dos órgãos.

3.6.1 Necrópsia

A avaliação anatomopatológica seguiu procedimentos operacionais padrão para necropsia.

3.6.2 Avaliação macroscópica e microscópica de órgãos

Após a eutanásia todos os cães foram submetidos a um detalhado e cuidadoso exame de toda a superfície externa corporal, dos orifícios e das cavidades craniana, torácica, e abdominal, e órgãos. O coração, fígado, vesícula biliar, rins, adrenais, testículos com epidídimo, ovários, útero, tireóide, paratireóide, timo, baço, encéfalo de todos os sistema-teste (exceto daqueles encontrados mortos e/ou submetidos à eutanásia por razões humanitárias antes do término do estudo) isentos de tecidos estranhos, foram pesados, ainda úmidos, logo após a dissecação. Também foram calculadas as relações órgão/peso corporal. Observou-se os órgãos considerando tamanho, cor, consistência, superfície externa superfície de corte, e quando se tratava de órgãos ocos, era examinado seu conteúdo. Foram colhidos fragmentos com aproximadamente 0,5 cm de espessura, colocados imediatamente em frascos contendo formol a 10% (fixador) por no mínimo 24 horas para fixação do material para confecção da lâmina histológica. As amostras foram retiradas do fixador e recortadas em fragmentos menores do tamanho a ser representado na lâmina proporcionalmente a cada órgão/espécie. Após a fixação do formol todos os fragmentos foram inseridos em cassetes para emblocagem, previamente identificados com código do animal e/ou estudo. Os cassetes foram processados no processador automático de tecidos (aparelho histotécnico) modelo PT 03 –LUPE® (Figura 12) e após o processamento no aparelho histotécnico, as amostras foram transportadas dentro dos cassetes para a inclusão da parafina na central compacta EasyPath® para a confecção dos blocos que ficam dispostos sobre a placa refrigerada Easypath® para que sequencialmente proceda a microtomia no Micrótomo EasyPath® e a confecção das lâminas (Figura 13). As lâminas levadas Corador de Lâminas Automático Bellatrix® (Figura 14), seguindo a coloração de rotina (hematoxilina-eosina), e após coloração finaliza-se a montagem da lâmina com a colocação da lamínula.

Foto 12 - Aparelho histotécnico



Fonte: Instituto Royal (2011)

Foto 13 - Central de inclusão, placa refrigerada, Figura 14 - Corador de lâminas automático microtômo e banho histológico



Fonte: Instituto Royal (2011)



Fonte: Instituto Royal (2011)

A observação das lâminas buscou identificar processos gerais presentes (degenerativo, inflamatório/reparação, alterações de hemodinâmica e hemostasia, alterações de crescimento e diferenciação celular), e as informações foram registradas em formulários controlados e auditados pela área de qualidade do Instituto Royal.

4 RESULTADOS

Os resultados hematológicos, bioquímicos obtidos estão demonstrados nas tabelas 1 a 9. Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas, portanto os valores estão demonstrados conjuntamente. Os resultados hematológicos ainda foram agrupados em série eritrocitária, leucocitária e plaquetária demonstrados nas tabelas 1, 2 e 3 respectivamente. Os dados bioquímicos foram agrupados em perfil hepático, renal, protéico, lipídico, iônico e glicêmico demonstrados nas tabelas 5 a 9 respectivamente. As tabelas 14 a 16 estão demonstradas os valores hematológicos encontrados em comparação aos da literatura, e os de bioquímica encontram-se nas tabelas 17 a 22.

Os achados anatomopatológicos obtidos das necrópsias dos cães estão demonstrados nas tabelas 10 e 11, e algumas fotos encontram-se nas figuras 14 a 20. Foram analisados em seus aspectos gerais, e divididos em: Sistema Circulatório, Sistema Respiratório, Sistema Digestivo, Sistema Genito-Urinário, Sistema Nervoso, Pele e Anexos.

A morfometria dos órgãos foi realizada para os principais órgãos requeridos pelas agências reguladoras de estudos em toxicologia para novos medicamentos. Calculou-se peso absoluto e relativo de: coração, fígado com vesícula biliar, rins, adrenais, testículos com epidídimo, ovários, útero, tireóide com paratireóide, timo, baço e encéfalo (Tabelas 12 e 13). Os valores de peso de órgãos em comparação com os da literatura encontram-se nas tabelas 23 e 24.

Tabela 1 - Valores da série eritrocitária

PARÂMETRO	UNIDADE	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	N
Eritrócitos	X10 ⁶ /mm ³	6,28	0,63	5,1	7,6	38
Hematócrito	%	42,5	3,89	34	57	38
Hemoglobina	g/dL	13,7	1,6	10,5	19,2	38
V.C.M.	fL	69,5	3,37	62	81,4	38
H.C.M	pg	22,5	2,35	22,0	25,1	38
C.H.C.M	%	32,2	2,01	25,1	37,7	38

Tabela 2 - Valores da série leucocitária

PARÂMETRO	UNIDADE	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	N
Leucócitos	mm ³	14.933	3.794	7.100	27.700	38
Mielócitos	mm ³	0	0	0	0	38
Metamielócitos	mm ³	0	0	0	0	38
Bastonetes	mm ³	1	0	0	130	38
Segmentados	mm ³	9.256	2.742	3.840	16.200	38
Eosinófilos	mm ³	323	384	0	2.890	38
Basófilos	mm ³	0	0	0	0	38
Linfócitos	mm ³	4.297	1.738	1.647	10.249	38
Monócitos	mm ³	1025	442	213	2.110	38

Tabela 3 - Valores plaquetários

PARÂMETRO	UNIDADE	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	N
Plaquetas	mm ³	379.701	97.958	154.000	596.000	38

Tabela 4 - Valores do perfil hepático

PARÂMETRO	UNIDADE	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	N
ALT	U/L	33,9	7,94	17,9	53,7	38
Fosfatase Alcalina	mg/dL	70	12,1	20	120	38

Tabela 5 - Valores do perfil renal

PARÂMETRO	UNIDADE	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	N
Creatinina	mg/dL	0,5	0,15	0,2	0,9	38
Uréia	mg/dL	31,6	6,44	17,4	47,3	38

Tabela 6 - Valores do perfil protéico

PARÂMETRO	UNIDADE	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	N
Proteínas Totais	g/dL	5,2	0,54	3,7	6,8	38
Albumina	g/dL	2,9	0,39	1,5	4	38

Tabela 7 - Valores do perfil lipídico

PARÂMETRO	UNIDADE	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	N
Triglicérides	mg/dL	38,9	11,95	13	75,4	38
Colesterol Total	mg/dL	161,5	36,18	81	273,2	38

Tabela 8 - Valores do perfil iônico

PARÂMETRO	UNIDADE	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	N
Cálcio	mg/dL	11,5	1,29	6,5	16,2	38
Cloretos	mEq/L	109,5	10,92	72,1	142	38
Potássio	mEq/L	4,6	0,41	3,8	6,4	38
Sódio	mEq/L	137	3,02	132	149	38
Fósforo	mg/dL	8	2,09	2,5	15,8	38

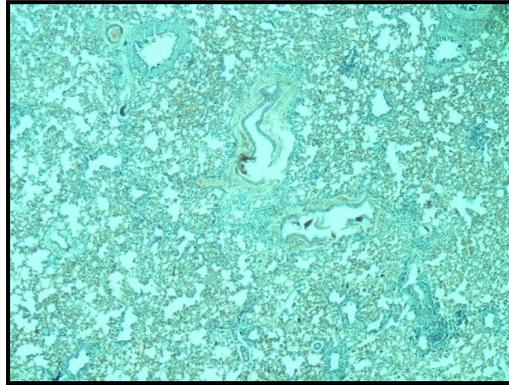
Tabela 09 - Valores do perfil glicêmico

PARÂMETRO	UNIDADE	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	N
Glicose	mg/dL	97	7,09	76,1	118	38

Tabela 10 - Achados Anatomopatológicos parte I.

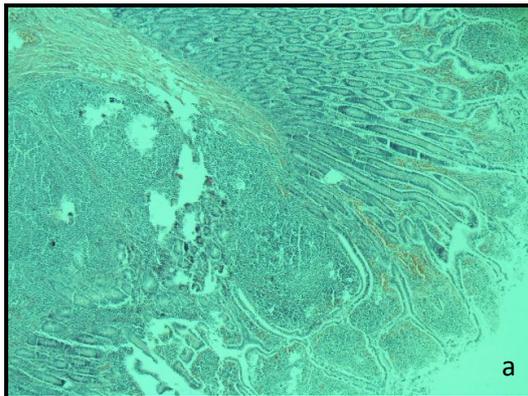
		ALTERAÇÃO	%	
GERAL		congestão polivisceral	38/38	100
		esplenomegalia com ou sem fibrose capsular	20/38	53
		congestão e petéquias tímicas	15/38	39
		hiperplasia linfóide (polpa branca)	12/38	32
CIRCULATÓRIO		depleção de polpa vermelha	2/38	5
		congestão e edema pulmonar	27/38	71
RESPIRATÓRIO		pneumonia intersticial crônica discreta	3/38	8
		glândula salivar: foco de inflamação crônica	1/38	3
		enterite catarral crônica (atrófica ou não)	38/38	100
		hiperplasia de placas de Peyer	37/38	97
		linfadenomegalia mesentérica	38/38	100
		gastrite crônica com ou sem hiperplasia linfóide	22/38	58
		erosão de mucosa gástrica	3/38	8
		corpúsculos de psammoma em mucosa gástrica	2/38	5
		Hepatomegalia	10/38	26
		congestão hepática e degeneração hidrópica difusa	17/38	45
DIGESTIVO		hepatite crônica multi-focal (incluindo microabcessos inativos)	4/38	11

Figura 15 - Pneumonia intersticial. Ojetiva de 4x. Coloração H.E.

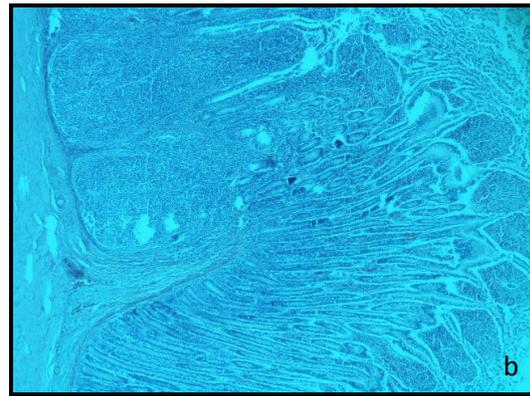


Fonte: Instituto Royal (2009)

Figura 16 a e b - Enterite catarral crônica com hiperplasia das placas de peyer. Objetiva 4x. Coloração H.E

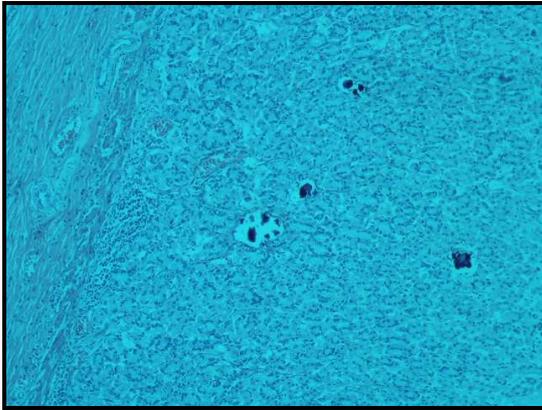


Fonte: Instituto Royal (2009)



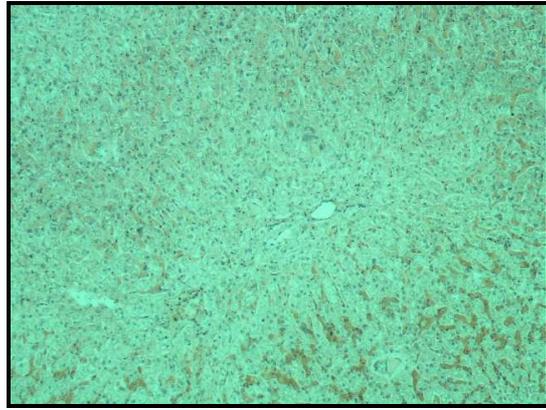
Fonte: Instituto Royal (2009)

Figura 17 - Corpúsculo de psammomas. Objetiva de 10x. Coloração H.E. Arquivo Insituto Royal



Fonte: Instituto Royal (2009)

Figura 18 - Degeneração Hidrópica. Objetiva de 10x. Coloração H.E. Arquivo Instituto Royal



Fonte: Instituto Royal (2009)

Tabela 11 - Achados Anatomopatológicos parte II.

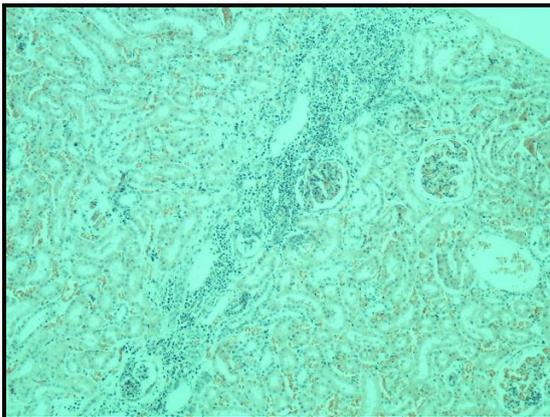
ALTERAÇÃO		%
	microcistos renais corticais	22/38 58
	aderência de cápsula renal	2/38 5
	nefrite intersticial crônica multi-focal	12/38 32
	células imaturas germinativas em lúmen de epidídimo	1/38 3
	focos de descamação de epitélio germinativo testicular	2/38 5
GENITO-URINÁRIO	hiperplasia endometrial	1/38 3
SNC	gliose discreta / moderada com nódulos gliais corticais, degeneração neuronal	25/38 66
	cisto hipofisário	2/38 5
	congestão zona reticular adrenal moderada a severa	2/38 5
	congestão zona medular adrenal	2/38 5
ENDÓCRINO	hiperplasia zona glomerulosa discreta	2/38 5
	dermatite crônica com lesões papulocrostosas	13/38 34
PELE-ANEXOS	prolapso bilateral da glândula da 3ª pálpebra e blefarite crônica	2/38 5

Figura 19 - Microcisto cortical renal



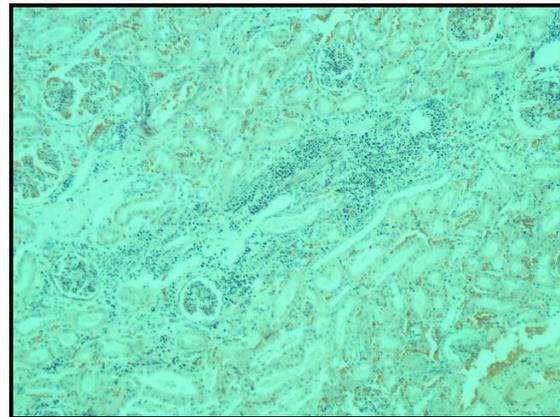
Fonte: Instituto Royal (2009)

Foto 20 - Nefrite Intersticial Crônica. Objetiva de 4x. Coloração H.E.



Fonte: Instituto Royal (2009)

Foto 21 - Nefrite Intersticial Crônica. Objetiva 10x. Coloração H.E.



Fonte: Instituto Royal (2009)

Tabela 12 - Peso Órgãos Machos e Fêmeas

	PARÂMETRO	MÉDIA	DESVIO	MÁXIMO	MÍNIMO	N
MACHO	PESO CORPORAL (Kg)	10,778	1,375	12,700	6,600	19
	CORAÇÃO (g)	90,794	10,854	109,000	62,600	19
	CORAÇÃO RELATIVO (g)	8,458	0,586	9,485	7,591	19
	FÍGADO (g)	430,983	76,121	529,600	231,400	19
	FÍGADO RELATIVO (g)	39,807	3,527	46,162	34,106	19
	RINS (g)	69,600	10,699	90,500	42,400	19
	RINS RELATIVO (g)	6,454	0,488	7,298	5,696	19
	ADRENAIS (g)	1,383	0,354	2,100	0,800	19
	ADRENAIS RELATIVO (g)	0,127	0,038	0,212	0,076	19
	TIREÓIDE (g)	1,075	0,255	1,500	0,800	8
	TIREÓIDE RELATIVO (g)	0,098	0,019	0,127	0,079	8
	TIMO (g)	16,822	4,665	24,900	8,300	19
	TIMO RELATIVO (g)	1,817	0,652	3,150	0,875	19
	BAÇO (g)	57,811	20,334	104,400	29,600	19
	BAÇO RELATIVO (g)	6,299	2,812	13,543	2,508	19
	CÉREBRO (g)	79,400	7,568	100,000	67,800	19
	CÉREBRO RELATIVO (g)	8,538	1,866	13,174	6,743	19
	FÊMEA	PESO CORPORAL (Kg)	9,756	1,615	13,600	7,600
CORAÇÃO (g)		81,606	13,855	118,800	62,300	19
CORAÇÃO RELATIVO (g)		8,399	0,809	9,628	6,839	19
FÍGADO (g)		451,544	110,350	636,200	306,600	19
FÍGADO RELATIVO (g)		45,992	6,341	62,373	35,615	19
RINS (g)		61,167	9,354	90,800	51,100	19
RINS RELATIVO (g)		6,316	0,656	7,816	5,257	19
ADRENAIS (g)		1,394	0,275	1,900	0,900	19
ADRENAIS RELATIVO (g)		0,148	0,034	0,202	0,099	19
TIREÓIDE (g)		0,963	0,334	1,500	0,500	8
TIREÓIDE RELATIVO (g)		0,103	0,031	0,160	0,055	8
TIMO (g)		14,972	3,941	21,800	8,500	19
TIMO RELATIVO (g)		1,427	0,768	2,705	0,026	19
BAÇO (g)		43,283	13,940	67,900	24,100	19
BAÇO RELATIVO (g)		4,263	2,313	8,410	0,065	19
CÉREBRO (g)		77,228	6,365	95,100	67,600	19
CÉREBRO RELATIVO (g)		7,454	3,543	12,160	0,127	19

Tabela 13 - Peso Órgãos Sistema Reprodutivo Machos e Fêmeas

PARÂMETRO		MÉDIA	DESVIO	MÁXIMO	MÍNIMO	N
MACHO	PESO CORPORAL (Kg)	10,778	1,375	12,700	6,600	19
	TESTÍCULO+EPIDIDIMO (g)	22,733	3,600	27,900	13,300	19
	TESTÍCULO+EPIDIDIMO RELATIVO (g)	2,443	0,613	3,676	1,402	19
FÊMEA	PESO CORPORAL (Kg)	9,756	1,615	13,600	7,600	19
	ÚTERO (g)	9,038	8,490	23,100	1,700	8
	ÚTERO RELATIVO (g)	0,956	0,867	2,169	0,202	8
	OVÁRIO (g)	1,688	0,591	2,700	0,700	8
	OVÁRIO RELATIVO (g)	0,181	0,053	0,241	0,077	8

Tabela 14 – Comparação parâmetros hematológicos – série eritrocitária

PARÂMETRO	UNIDADE	INSTITUTO ROYAL	(BUSH, 2004)	(DERELANKO, 2002)	(KANTEK, 2005)	N
Eritrócitos	X10 ⁶ /mm ³	6,28 +- 0,63	5,5-8,5	9,0-13,0	5,0-8,0	38
Hematócrito	%	42,5 +- 3,89	37,0-55,0	41,5-54,6	37-55	38
Hemoglobina	g/dL	13,7 +- 1,6	12,0-18,0	14,5-18,8	12,0-18,0	38
V.C.M.	fL	69,5 +- 3,37	60,0-77,0	65,0-72,0	60-77	38
H.C.M	pg	22,5 +- 2,35	19,5-24,5	21,5-25,2	*	38
C.H.C.M	%	32,2 +- 2,01	32,0-36,0	33,0-36,00	31-36	38

Tabela 15 - Comparação dos parâmetros hematológicos – série leucocitária

PARÂMETRO	UNIDADE	INSTITUTO ROYAL	(BUSH, 2004)	(KANTEK, 2005)	(MEINKOTH; CLINKENBEARD, 2000)	N
Leucócitos	mm ³	14.933 +- 3.794	6.000-17.000	6.000-15.000	6.000-17.000	38
Mielócitos	mm ³	0	0	0	0	38
Metamielócitos	mm ³	0	0	0	0	38
Bastonetes	mm ³	1	0-300	0-500	0-300	38
Segmentados	mm ³	9.256 +- 2.742	3.000-11.500	3.000-11.000	3.000-11.500	38
Eosinófilos	mm ³	323 +- 384	100-1.250	100-1.200	100-1.250	38
Basófilos	mm ³	0	0	0	0	38
Linfócitos	mm ³	4.297 +- 1.738	1.000-4.800	1.000-5.000	1.000-4.800	38
Monócitos	mm ³	1.025 +- 442	150-1.350	100-1.300	150-1.350	38

Tabela 16 - Comparação parâmetros hematológicos – série plaquetária

PARÂMETRO	UNIDADE	INSTITUTO ROYAL	(BUSH, 2004)	(DERELANKO, 2002)	(BACKER, 2004)	N
Plaquetas	mm ³	379.701 +- 97.958	200.000-500.000	150.000-400.000	20.000-500.00	38

Tabela 17 – Comparação parâmetros bioquímicos – perfil hepático

PARÂMETRO	UNIDADE	INSTITUTO ROYAL	(GONZÁLEZ et al., 2001; SANTARÉM; JOSÉ; LAPOSY, 2008)	(KANEKO et al., 1997)	N
ALT	UI/L	33,9 +- 7,94	21-102	10,0-50,0	38
Fosfatase Alcalina	mg/dL	70 +- 12,1	20-152	20-156	38

Tabela 18 - Comparação parâmetros bioquímicos – perfil renal

PARÂMETRO	UNIDADE	INSTITUTO ROYAL	(BUSH,2004)	(GONZÁLEZ et al., 2001)	N
Creatinina	mg/dL	0,5 +- 0,15	0,5-1,5	0,5-1,5	38
Uréia	mg/dL	31,6 +- 6,44	15-40	21-60	38

Tabela 19 – Comparação parâmetros bioquímicos – perfil protéico

PARÂMETRO	UNIDADE	INSTITUTO ROYAL	(BUSH,2004)	(KANEKO et al., 1997)	N
Proteínas Totais	g/dL	5,2 +- 0,54	5,7-7,7	5,4-7,1	38
Albumina	g/dL	2,9 +- 0,39	2,5-4,0	2,6-3,3	38

Tabela 20 - Comparação parâmetros bioquímicos – perfil lipídico

PARÂMETRO	UNIDADE	INSTITUTO ROYAL	(BUSH,2004)	(SCHIMDT, 2004)*	N
Triglicérides	mg/dL	38,9 +- 11,95	50-100		38
Colesterol Total	mg/dL	161,5 +- 36,18	100-300	130-270*	38

Tabela 21 - Comparação parâmetros bioquímicos – perfil iônico

PARÂMETRO	UNIDADE	INSTITUTO ROYAL	(BUSH,2004)	(GONZÁLEZ et al., 2001*; BUDZIAK, 2010**)	N
Cálcio	mg/dL	11,5 +- 1,29	8,0-12,0	9,0-12,0*	38
Cloretos	mEq/L	109,5 +- 10,92	100-120	-	38
Potássio	mEq/L	4,6 +- 0,41	3,6-5,8	4,4-5,3**	38
Sódio	mEq/L	137 +- 3,02	140-155	141-152**	38
Fósforo	mg/dL	8 +- 2,09	2,5-5,0	2,6-6,2)*	38

Tabela 22 - Comparação parâmetros bioquímicos – perfil glicêmico

PARÂMETRO	UNIDADE	INSTITUTO ROYAL	(DERELANKO, 2002)	(GONZÁLEZ et al., 2001)	N
Glicose	mg/dL	97 +- 7,09	60-100	65-118	38

Tabela 23 - Comparação peso de órgãos machos e fêmeas

PARÂMETRO	Instituto Royal	(DAVIES; MORRIS, 1993)	(CHOI et al., 2011)
MACHO			
PESO CORPORAL (Kg)	10,777 +- 1,375	10,00	9,86 +- 0,94
CORAÇÃO (g)	90,794 +- 10,854	80,00	76,86 +- 9,73
FÍGADO (g)	430,983 +- 76,121	320,00	268,40 +- 41,36
RINS (g)	69,6 +- 10,699	50,00	39,95 +- 4,72
ADRENAIS (g)	1,383 +- 0,354	1,00	1,07 +- 0,19
TIREÓIDE (g)	1,075 +- 0,255	*	0,78 +- 0,09
TIMO (g)	16,822 +- 4,665	*	5,58 +- 1,77
BAÇO (g)	57,811 +- 20,334	25,00	27,44 +- 5,111
CÉREBRO (g)	79,4 +- 7,568	80,00	73,64 +- 5,10
FÊMEA			
PESO CORPORAL (Kg)	9,755 +- 1,615	10,00	8,74 +- 1,25
CORAÇÃO (g)	81,605 +- 13,85	80,00	68,52 +- 9,53
FÍGADO (g)	451,544 +- 110,350	320,00	246,92 +- 50,65
RINS (g)	61,166 +- 9,353	50,00	34,80 +- 7,35
ADRENAIS (g)	1,394 +- 0,275	1,00	1,06 +- 0,16
TIREÓIDE (g)	0,962 +- 0,333	*	0,65 +- 0,14
TIMO (g)	14,972 +- 3,911	*	5,03 +- 1,57
BAÇO (g)	43,283 +- 13,940	25,00	25,75 +- 3,65
CÉREBRO (g)	77,227 +- 6,364	80,00	71,29 +- 4,90

N Machos= 19 e N Fêmeas = 19

Tabela 24 - Comparação do peso de órgãos sistema reprodutivo de machos e fêmeas

PARÂMETRO	Instituto Royal	(CHOI,et al. 2011)	N
PESO CORPORAL (Kg)	10,777 +- 1,375	9,86 +- 0,94	19
TESTÍCULO+EPIDIDIMO (g)	22,733 +- 3,6	15,71 +- 3,30	19
PESO CORPORAL (Kg)	9,755 +- 1,615	8,74 +- 1,25	19
ÚTERO (g)	9,037 +- 8,490	11,39 +- 7,64	19
OVÁRIO (g)	1,687 +- 0,591	0,88 +- 0,72	19

5 DISCUSSÃO

O presente estudo visou estabelecer valores padrão para a raça Beagle, criados para experimentação e discutir perspectivas relativas à utilização de animais criados em biotério, e, a partir disso, definir o perfil dos principais parâmetros exigidos em estudos toxicológicos: hematologia, bioquímica e anatomopatologia, como descrevem ANVISA (2010) e Tian et al. (2004).

Segundo Cardoso et al. (2011), o paradigma biotecnocientífico no mundo contemporâneo vem do fato que todos nós estamos envolvidos com os efeitos da interferência da ação humana no desenvolvimento da ciência e meio ambiente. Dentre os efeitos da interferência temos, por exemplo, a fecundação *in vitro*, modificações de plantas e animais pela manipulação e reprogramação dos genes, uso de novas terapêuticas que utilizam medicamentos ou células vivas de animais. Toda a atividade biotecnológica que requer a utilização de animais exige qualidade e controle das variáveis que possam interferir no resultado experimental. Por isso, um dos maiores desafios atuais no Brasil é desenvolver a produção de animais em biotérios com qualidade e biossegurança adequados. Para isso, um conjunto de ações deve ser instituído nos biotérios de criação e experimentação animal, como, reestruturação das edificações que sejam internacionalmente reconhecidas para cada espécie, suporte laboratorial adequado, controle ambiental e sanitário, profissionais com qualificação e treinamento, utilizar de procedimentos baseados nas boas práticas laboratoriais, e ainda como sugere AAALAC (2012), os biotérios devem possuir instalações físicas e métodos que permitam a manutenção do bem-estar animal e conforto, e desenvolver um programa sólido de atendimento veterinário que avalie a aquisição, transporte, medicina preventiva, controles histórico da saúde, que tenha instituído principalmente protocolos de anestesia, analgesia e eutanásia.

Ao utilizar a ciência de laboratório como base para as demais ciências e considerar o bem-estar animal como um dos principais fatores que podem influenciar o resultado de um experimento, paralelamente o ambiente físico, sanidade, genética e manejo definem a qualidade do animal produzido contribuindo para a

confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados experimentais, assim como afirmam Frajblat, Amaral e Rivera (2008) e Cardoso et al. (2011) em seus estudos.

O biotério de cães do presente estudo possui procedimentos operacionais padrões estabelecidos que atendem o bem-estar animal nas questões ambientais, sanitárias, e legais o que nos permite obter dados mais seguros, mas ainda há um caminho a ser percorrido para chegar excelência preconizada por AAALAC (2012), assim como a maioria dos biotérios brasileiros. Cunningham (1996) define que animais submetidos a habitat estressante têm diminuição de interação social, locomoção, depressão imunológica, o que conseqüentemente, leva ao aumento do potencial de doenças, deficiências nutricionais e alterações de comportamento. Por isso, é importante estabelecer nos biotérios o enriquecimento ambiental, pois para os animais submetidos à pesquisa melhora as condições gerais de saúde, diminuem os níveis de agressão, melhora a manipulação no laboratório, diminui os níveis de hormônios suprarrenais associados ao estresse, diminui a frequência de comportamento esterotipado, melhora a taxa de acasalamento e melhora o comportamento social com o grupo, como confirma em seus estudos Reinhardt (2006). Portanto, cabe ao laboratório que utiliza animais melhorar a qualidade do ambiente visando sempre o bem-estar animal, como descrevem Baumans (2005); Reinhardt (2006) e Verwer e Hendriksen (2004). O cão possui grande necessidade de contato visual, tátil e auditivo interespecie e com o ser humano, e para evitar problemas comportamentais que possam afetar a saúde, sugere-se que o laboratório tenha um programa constante de manejo social entre indivíduos e com o homem, como diz Jennings (2004). Clausing (2004) e Frajblat, Amaral e Rivera (2008) consideram que um animal feliz é um animal saudável, portanto, um animal confiável para os procedimentos experimentais e proporcionando bons resultados para ciência.

Uma questão relevante aos métodos de determinação dos perfis hematológicos, bioquímicos e anatomopatológicos dos cães da raça Beagle destinados à experimentação científica, é que, além da obrigatoriedade legal para realizar os testes pré-clínicos para o desenvolvimento de novos medicamentos, como descreve ANVISA (2010), existe uma preocupação em responder à sociedade, no sentido de minimizar o estresse e dor causados nos procedimentos experimentais, e promover a redução do número de animais utilizados (CLAUSING,

2004; LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2010). Além disso, ao conhecer o histórico de saúde e perfis do animal utilizado, o resultado experimental terá maior confiança, e conseqüentemente poderá ser utilizado menor número de animais.

A pré-seleção de cães para pesquisa científica compreende basicamente a avaliação minuciosa de todas as informações clínicas, hematológicas e bioquímicas. Porém, FELASA (2010) recomenda que o monitoramento da saúde do cão deve envolver também a avaliação bacteriológica, virológica e parasitológica do plantel periodicamente. Estas avaliações auxiliam no momento da decisão correta sobre o uso ou não dos cães, frente a uma alteração nos parâmetros envolvidos (BUSH, 2004). Portanto, ampliar o número de exames laboratoriais ajuda a definir cada vez melhor a qualidade do animal produzido evitando o uso inadequado e inútil do animal, assim como perdas econômicas.

É importante destacar, que os intervalos de valores normais esperados não devem ser considerados completamente inflexíveis e inalteráveis, porque variações nos métodos dos testes podem causar pequenas diferenças entre laboratórios. Alguns valores de animais normais ficarão dentro da faixa de referência e alguns anormais que sofrem de doenças também. Porém, valores próximos aos limites superiores e inferiores de uma faixa de normalidade têm significado e devem ser observados. Por isso, definir qual o perfil da espécie e da raça é importante para avaliação e conclusão final da saúde animal, como afirma Bush (2004).

A interpretação dos achados laboratoriais geralmente é baseada no uso de informações do próprio controle histórico (pré-tratamento e monitoramento da saúde animal), em comparação a uma população controle e bem-definida. Os valores de referência são específicos para a população em estudo, e em conformidade com os princípios da patologia e medicina interna veterinária, como mostra Bloom (1993).

No presente estudo, os valores encontrados para a série eritrocitária, demonstrado na tabela 14, revela que todas as determinações hematológicas encontram-se dentro dos valores de referência, como proposto em literatura por Bush (2004), Derelanko (2002) e Kantek (2005), porém os autores descerevem os valores em cães de uma forma geral, e não da raça Beagle. A tabela 15 demonstra a comparação dos parâmetros hematológicos da série leucocitária nos quais corroboram com determinações encontradas em Bush (2004); Kantek (2005) e

Meinkoth e Clinkenbeard (2000) exceto nos parâmetros de leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos.

O valor do limite superior de linfócitos observado foi de 6.035mm^3 , diferindo, portanto, dos valores de referência encontrados em literatura em Kantek (2005), 4.800mm^3 , e em Bush (2004) e Meinkoth e Clinkenbeard (2000) 5.000mm^3 . Segundo Bush (2004), pode-se observar em animais a linfocitose fisiológica que pode acontecer em presença do medo, excitação ou estresse. Além disso, segundo Biondo (2005), somente acima de duas vezes o limite superior do valor de referência à leucocitose demonstra preocupação clínica, e, caso seja superior, pode acontecer em resposta a catecolaminas, processos infecciosos, hipoadrenocorticismo e neoplasias.

O valor do limite superior de monócitos observado foi de 1.467mm^3 diferindo, portanto, dos valores de referência encontrados em literatura (1.350mm^3) em Bush (2004); Kantek (2005) e Meinkoth e Clinkenbeard (2000). Segundo Silva (2005) e Bush (2004), a monocitose discreta pode estar associada a uma resposta ao estresse induzida por aumento da concentração de glicocorticoides na circulação sanguínea e considerada uma resposta inespecífica. Além disso, segundo Biondo (2005), somente acima de duas vezes o limite superior do valor de referência a monocitose demonstra preocupação clínica, pois pode caracterizar processos inflamatórios, necrose, terapia responsiva a corticoides, estresse e neoplasias.

Em neutrófilos segmentados, observou-se que o valor do limite superior encontrado (11.998mm^3) é maior quando comparado aos valores de referência encontrados na literatura em Kantek (2005), 11.000mm^3 , e em Bush (2004) e Meinkoth e Clinkenbeard (2000) 11.500mm^3 , porém discreto. O aumento de neutrófilos segmentados acontece em resultado da liberação da adrenalina desencadeada pela excitação ou medo, que podem ser gerados durante a manipulação experimental, ainda que os animais sejam treinados para tal. Adrenalina promove uma distribuição discreta e transitória de neutrófilos no compartimento marginal para o circulante com duração aproximada de 30 minutos, podendo ser esta a explicação para a discreta elevação observada no valor médio, quando comparado com a literatura (BUSH, 2004).

O valor do limite superior de leucócitos foi de 18.727 mm³ diferindo, portanto, dos valores de referência encontrados em literatura (17.000 mm³) em Bush (2004), Kantek (2005) e Meinkoth e Clinkenbeard (2000). Segundo, Dukes (1996), a leucocitose fisiológica ocorre durante a prática de exercícios e em condições de estresse. Diante deste quadro de alterações hematológicas encontradas é importante lembrar que cães que vivem em canis são constantemente submetidos a situações de estresse devido às mudanças de ambiente e manejo, introdução de novos indivíduos no grupo resultando no estresse de estabelecer novas relações (BEERDA et al., 1999; BEAVER, 2008). E, ainda, segundo, Palermo-Neto, Massoco e Souza (2003) o estresse é um dos principais mecanismos de alterações do sistema imune. A ação dos glicocorticoides liberados na situação de estresse inibe a transcrição de genes para várias interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-13, IL16), fator de necrose tumoral (TNF) e, interferon γ (IFN- γ) (ADER, 2007) e da atividade de macrófagos e de neutrófilos (ALVES et al., 2006). Segundo Silva et al. (2008), a condição de estresse leva o organismo a fazer um perfil de leucograma de estresse fisiológico alterando os parâmetros hematológicos acima citados. Por isso, cães que vivem em biotério estão sob condição de estresse constante pelo ambiente ou manejo, portanto, o perfil laboratorial e anatomopatológico irá principalmente descrever estas condições.

Por último, a tabela 16 também demonstra que os parâmetros plaquetários encontram-se dentro dos padrões de referência apresentado por Bush (2004); Derelanko (2002) e Backer (2004).

Os valores bioquímicos encontrados e demonstrados nas tabelas 17 a 22 revelam que todas as determinações bioquímicas encontram-se dentro dos valores de referência propostos em literatura por Bush (2004); Derelanko (2002) e Kantec (2005). O perfil bioquímico possui papel fundamental na interpretação dos dados contribuindo para conclusão final da saúde animal (BLOOM, 1993; BUSH, 2004).

Não foram encontrados trabalhos nacionais apresentando dados de referência hematológicos e bioquímicos para cães da raça Beagle, o que torna este trabalho inédito no Brasil.

O perfil anatomopatológico descrito no presente estudo definiu-se com o peso de órgãos e a avaliação microscópica e macroscópica de órgãos como exige os

estudos toxicológicos (OECD, 1998; MORTON et al., 2006; ANVISA, 2010). A ausência de trabalhos que definem o perfil anatomopatológico do cão Beagle em estudos toxicológicos dificulta e empobrece a discussão da correlação de peso de órgão e achados anatomopatológicos. Segundo Hottendorf e Hirth (1974), lesões espontâneas, como por exemplo, prolapso da terceira pálpebra, são comumente encontradas em cães Beagle saudáveis e que não apresentam sintomatologia clínica e não apresentam alterações laboratoriais.

Sabe-se que a avaliação do peso de órgãos em estudos toxicológicos é um componente integral na avaliação dos testes de produtos farmacêuticos, produtos químicos e dispositivos médicos (CRISSMAN et al., 2004; MORTON et al., 2007). O peso de órgãos e os achados patológicos descrevem o perfil anatomopatológico dos cães. A comparação de peso de órgãos de machos e fêmeas corrobora com os valores de referência descritos em literatura e estão descritos na tabela 23 e 24 (DAVIES; MORRIS, 1993; CHOI et al., 2011).

Segundo Morton et al. (2007), na prática, a pesagem dos órgãos de animais provenientes de estudos toxicológicos voltados para produtos farmacêuticos, sanidade animal, química, alimentícia/nutricional e produtos de consumo indústrias em todo o mundo revela notável variação dos valores do peso do órgão, portanto definir valores de referência torna-se fundamental nos estudos toxicológicos.

Na necropsia todos os achados, mesmo os individuais, devem servir de rastreamento de lesão e correlação com os achados histopatológicos. O patologista deve estar ciente de que as alterações no peso do órgão frequentemente podem indicar lesão, e devem ser consideradas na análise histopatológica, como descreveu Morton et al. (2006) e Choi et al. (2011).

No processo de eutanásia nos estudos pré-clínicos utiliza-se tiopental sódico por causar pouca ou nenhuma alteração laboratorial (EMEA, 1999; CLEFF et al., 2008). O tiopental é um fármaco altamente lipossolúvel, alcança sua concentração máxima no cérebro cerca de um minuto após sua administração, e após o término da injeção, a concentração plasmática do tiopental cai, à medida que ele se difunde para outros tecidos, como os músculos, e outros órgãos auxiliam na metabolização deste fármaco, como o rim, cérebro, músculo, coração e jejuno. Em cães somente 5% da dose total do fármaco é biotransformada por hora (EMEA, 1999; FANTONI

CORTOPASSI; BERNARDI, 1999; LOPES, 2009). Este fármaco possui pka de 7,6 e atinge rapidamente o cérebro em 30-45 segundos e se distribui para o resto do corpo em cerca de 5-10 minutos em tecidos altamente perfundidos e que tenham alguma distribuição de gordura, e seu metabolismo principal ocorre no fígado (EMEA, 1999; CARREGARO; CASTRO; MARTINS, 2005). Por isso, a Sociedade de Toxicologia Patológica norte-americana recomenda que o peso de órgãos deva ser executado imediatamente após o óbito ou eutanásia a fim de minimizar os possíveis efeitos do *post mortem* ou do anestésico utilizado. Portanto, os dados de controle histórico devem ser atualizados regularmente para minimizar o desvio nos dados de peso de órgãos estabelecidos ao longo do tempo no laboratório, como descritos no trabalho de Morton et al. (2007).

Congestão, degeneração hidrópica e petéquias observadas após eutanásia, em diversos órgãos (timo – 39%, baço – 52%, pulmão – 71%, fígado - 45% e adrenais – 2%) acontecem pela obstrução física de pequenos e grandes vasos pela falha do fluxo sanguíneo. O sangue se acumula em capilares e vênulas dilatando os tecidos, podendo ser generalizada ou localizada (THOMSON, 1993), sendo portanto, um achado sem significado clínico.

Neste estudo observou-se em 5% dos cães, hiperplasia das placas de peyer em 97%, hiperplasia linfoide da polpa branca em 32% e hiperplasia endometrial 1%. A hiperplasia pode ocorrer sem explicação conhecida, sendo frequentemente encontrados em baço e pâncreas de cães velhos, e no córtex da adrenal, próstata e glândula mamária (THOMSON, 1993). Em 97% dos cães observou-se a hiperplasia das placas de Peyer, que são aglomerados de nódulos linfáticos localizados principalmente na mucosa do íleo (ROBBINS; COTRAN, 2005). Como destacado anteriormente, cães submetidos a estresse de cativeiro e manejo constante ficam imunodeprimidos, portanto, o estresse agudo altera as funções gastrointestinais, através do sistema nervoso autônomo, e a ativação do sistema nervoso simpático e inibição da atividade vagal, resultam numa inibição seletiva da motilidade gástrica e do intestino delgado, bem como, da secreção de ácido e de enzimas digestivos (KYRON et al., 2006). Como o objetivo do sistema imune é manter um equilíbrio, podemos inferir que a manipulação e a realização dos testes podem levar à ativação dos principais órgãos imunes, desencadeando alta atividade das placas de Peyer (ROBBINS; COTRAN 2005). Erosão da mucosa gástrica vista em 8% dos cães deste estudo, pode estar acontecer devido ao aumento da secreção gástrica frente a

estímulos estressantes de cativeiro e manejo experimental (KYRON et al., 2006). Ainda, segundo Hottendorf e Hirth (1974), alterações comuns de grande frequência em cães não são interpretadas como lesões, como são a hiperplasia moderada de folículos linfáticos no piloro, intestino delgado, ceco e a vesícula biliar, congestão dos linfonodos mesentéricos, mucosa gastorintestinal e áreas focais de baço (hiperplasia linfoide da polpa branca em 32% e depleção da polpa branca em 5% dos cães deste estudo) e variações no número de células parafoliculares na glândula tiroide. Porém, as alterações em baço devem ser consideradas se estiverem sendo testadas drogas com efeitos no sistema imune. Por último, a hiperplasia endometrial pode decorrer de acordo com a fase estral da cadela (BUSH, 2004) e deve-se dar maior atenção a este achado se este animal for utilizado em testes de drogas, considerando que possam apresentar efeitos estrogênicos.

A linfadenomegalia mesentérica que aparece em 100% dos cães deste estudo pode ter relação com a reação do sistema imunológico do cão frente a um agente, e funcionando como indicadores de doenças nos tecidos. Embora o aumento dos nódulos linfáticos detectados possa ser normal, existe um grande número de processos de doença que pode levar a linfadenopatia mesentérica. Os nódulos linfáticos atuam como filtros, e vemos a hiperplasia reativa dos nódulos linfáticos em presença de processos infecciosos, processos inflamatórios, e neoplásicos (LUCY et al., 2005). Segundo Mc Tavisch (2002), a hipersensibilidade do tecido associado ao intestino pode ser secundária à inflamação causada por agentes não identificados ou podendo incluir a *Giardia sp* que em canis, o parasita pode ser encontrado em até 100% dos cães (BECK et al., 2005). Porém, cães submetidos a estresse apresentam alterações imunológicas constantes, portanto, este achado pode ser incluído no perfil de cães criados em biotério.

Vimos ainda, no perfil gastroentérico dos cães do presente estudo, gastrite crônica em 58%, e erosão da mucosa em 8%, sendo achados comumente encontrados em cães de biotério. Segundo Takemura et al. (2007), a presença de infiltrado inflamatório mononuclear compatível com gastrite crônica discreta tem sido um achado comum em cães, independentemente da presença ou não de sinais clínicos ou de *Helicobacter sp*. E, ainda segundo Castro (1999), cães de biotério apresentam congestão da mucosa gástrica com infiltrado inflamatório discreto de células polimorfonucleares e mononucleares. Portanto, quando avaliarmos comparativamente o perfil encontrado com os animais em experimento deve-se

considerar estas alterações, e com detalhamento se estivermos testando fármacos aplicados por via oral.

Os corpúsculos de psamomma foi um achado encontrado em 5% dos cães avaliados. Estes corpúsculos são estruturas arredondadas, calcosferitos concentricamente laminados que variam de 5 a 100um de diâmetro. Este achado deve ser considerado na avaliação comparativa entre grupo controle e em cães de experimento dependendo do tipo de fármaco avaliado, pois pode indicar certos tipos de tumores, incluindo carcinoma papilar da tiróide, meningioma e papilares tumores serosos do ovário, e, em menor extensão podem ser encontrados na leiomiomas e angiomas do trato gastrointestinal (ERDOGAN et al., 2011).

A esplenomegalia foi observada em 53% dos cães avaliados. Por se tratar de órgão importante nos processos imunológicos, a esplenomegalia deve ter uma atenção especial. Como descreve Jannini et al. (2003), o baço corresponde à maior unidade do sistema mononuclear fagocitário, constituindo-se no maior acúmulo de tecido linfóide do organismo e o único órgão dessa natureza interposto na circulação sanguínea. A esplenomegalia pode estar relacionada com processos infecciosos, estados congestivos da hipertensão portal, distúrbios linfo-hematogênicos, condições imunológico-inflamatórias, doenças de armazenamento, neoplasias primárias e secundárias e outras. Por esses motivos, a avaliação clínica do tamanho do baço é de grande utilidade, sendo, entretanto, pouco exata e com limitações (JANNINI et al., 2003), outros testes diagnósticos complementares podem ser aplicados na avaliação esplênica pré-estudos dos cães, como citologia aspirativa, ultrassonografia, radiografia, a aspiração da medula óssea, como sugere Ferreira (2007) para melhor refinar a análise desta alteração. Em estudos que envolvam diretamente o sistema imunológico deve-se ter atenção redobrada a este órgão e suas alterações.

A enterite catarral observada em 100% dos cães é vista como uma lesão comumente encontrada e considerada um achado normal (HOTTENDORF; HIRTH, 1974). Nas glândulas salivares observou-se foco de inflamação crônica em 3% dos cães. Segundo Pignone et al. (2010), a glândula salivar de cães e gatos podem ter origem inflamatória, neoplásica e traumática, contudo o diagnóstico diferencial torna-se fundamental para direcionar seu tratamento. Deve-se observar minuciosamente essa alteração através de exames complementares para refinar melhor a pré-seleção dos cães.

Cães que vivem em canis estão frequentemente expostos a bactérias e vírus do aparelho respiratório, como *Bordeleta bronchiseptica*, que tem sido associada a infecções respiratórias em cães, e em associações com vírus da parainfluenza canina (CPIV), o adenovírus canino do tipo 2 (CAV-2), adenovírus canino tipo 1 (CAV-1), o vírus da cinomose (CDV), os micoplasmas, ureaplasmas, herpesvírus e reovírus (FERNANDES; COUTINHO, 2004). A *Bordeleta bronchiseptica* pode persistir no aparelho respiratório por aproximadamente três meses, e tem sido isolada do trato respiratório superior de cães clinicamente saudáveis. Em infecções mistas de *B.bronchiseptica* e *CPIV*, a injúria dos órgãos é maior e o animal poderá apresentar quadro de pneumonia. Em animais imunocompetentes, a infecção tem curta duração, e o CAV-2 pode promover infecção nas células alveolares, levando a uma pneumonia intersticial. A doença pode afetar mais de 50% dos animais, em locais com alta densidade populacional, e pode ocorrer em qualquer época do ano (FERNANDES; COUTINHO, 2004), o que nos leva a inferir que a pneumonia intersticial crônica discreta observada em 8% dos cães do estudo aconteça devido à exposição de alguns microrganismos citados acima. Na presença desse achado no grupo controle deve ser avaliado minuciosamente pelo patologista considerando a droga utilizada, podendo até mesmo ser excluído das análises comparativas. Podem-se introduzir periodicamente no biotério exames laboratoriais complementares como lavado traqueal seguido da análise citológica e microbiológica para reconhecimento de microrganismos estabelecidos no local, visando um controle histórico do plantel, e complementando o perfil dos animais utilizados, como sugere Melchert et al. (2008).

Notou-se congestão e edema pulmonar em 71% dos cães avaliados, devido à estase do sangue no *post mortem* (ROBBINS; COTRAN 2005).

A hepatite crônica multifocal aparece em 11% cães sem apresentar sintomatologia clínica ou laboratorial. No entanto, devido à grande capacidade de reserva funcional do fígado, no caso de hepatopatia crônica oculta, os sinais clínicos podem ser vagos ou inespecíficos (êmese, diarreia, anorexia, letargia e perda de peso), dificultando o diagnóstico. Nos cães, as hepatopatias crônicas são muito mais comuns do que as doenças hepáticas agudas. A doença hepática crônica compreende uma variedade de processos patológicos que podem afetar cães de várias idades (KITAMURA, 2006). No diagnóstico de doenças hepáticas vários

aspectos devem ser considerados, como a história do indivíduo, exames laboratoriais e manifestações clínicas que geralmente ocorrem após 70% de comprometimento da capacidade funcional do fígado (MENDONÇA, 2004). Os cães avaliados no presente estudo não apresentavam manifestações clínicas, assim como, alterações laboratoriais, porém, visando a seleção para estudo, outros exames complementares podem ser feitos previamente para refinar possíveis alterações primárias ou secundárias, como citologia aspirativa, biópsia hepática ou ultrassonografia, porém sabe-se que é necessário ter pessoal capacitado e o custo muitas vezes torna-se inviável, como descreveu Mendonça (2004) e Costa et al. (2005). Atualmente, a farmacogenômica vem auxiliando a ciência na compreensão de como os fatores genéticos podem contribuir para a eficácia e a segurança de um medicamento. Os estudos das enzimas hepáticas, como as CYP, poderá ser uma ferramenta útil para definir o perfil de um cão Beagle como modelo para toxicologia, merecendo estudos futuros. Essa ferramenta traria um maior sucesso no teste de novos medicamentos e reduziria custos, e pouparia animais (KAMIMURA; 2006; GRAHAM et al., 2006; METZGER; SOUZA-COSTA; TANUS-SANTOS, 2006;).

No sistema Genito-Urinário achados de *post mortem* como microcistos renais corticais, não possuem significado clínico (ROBBINS; COTRAN 2005) e sua importância principal reside na diferenciação de tumores renais, e ao contrário dos tumores os cistos apresentam contornos lisos, são avasculares e formam sinais líquidos em vez de sólidos (ROBBINS; COTRAN 2005). A nefrite intersticial crônica multifocal foi um achado em 32% dos cães, sendo que muitos fatores podem levar tal lesão, incluindo esquiemia de segmentos tubulares abaixo dos glomérulos, inflamação aguda e crônica no interstício adjacente e lesão ou perda do suprimento sanguíneo capilar tubular. Na nefrite aguda tem início clínico rápido e caracteriza histologicamente por edema intersticial, acompanhada por infiltração leucocitária do interstício e túbulos, e necrose tubular focal (ROBBINS; COTRAN 2005). Por outro lado na nefrite crônica, vemos a presença de infiltrado de leucócitos predominantemente mononucleares, fibrose intersticial proeminente e atrofia tubular. Os sinais clínicos podem ser sutis como uma leve diminuição da capacidade de concentrar urina. Vale lembrar que na maioria dos pacientes com infecção do sistema urinário, os microrganismos infectantes são da própria microbiota fecal que alcançam o órgão por via hematogena ou por infecção ascendente (ROBBINS; COTRAN 2005). A aderência na cápsula renal vista em 5% dos cães é o principal

indicativo macroscópico de nefrite (MONTENEGRO et al., 2010). A presença de nefrite deve ser considerada relevante principalmente por se tratar de estudos toxicológicos, e devem-se considerar estas alterações pertinentes se estiverem sendo testados fármacos com potencial nefrotóxico ou com excreção renal.

Em um pequeno número visto nos cães (3%), as células germinativas em lúmen de epididimo são células multipotenciais que podem se tornar cancerosas, esta informação se torna importante devido à observação do aumento global na incidência de tumores das células germinativas, e nos Estados Unidos observou-se que estão relacionadas a aproximadamente 10% das mortes por câncer ao ano, em humanos (ROBBINS; COTRAN 2005; THOMÉ, 2006). Quanto aos achados de focos de descamação de epitélio germinativo testicular em 5%, como descreve Thomé (2006), a perda das células do epitélio germinativo está associada à redução do tamanho testicular, ou seja, hipoplasia testicular, isto ocorre devido ao fato de 50% a 70% do volume testicular ser derivado dos túbulos seminíferos. E, ainda, segundo Domingos e Salomão (2011), os estudos relacionados ao padrão de normalidade dos testículos de cães, assim como o das alterações testiculares e, conseqüentemente, sua influência sobre a fertilidade dos animais, são escassos. É importante avaliar cuidadosamente as alterações em sistema reprodutor quando a droga testada possuir efeitos diretos sob os órgãos correlacionados.

Os achados do sistema nervoso como gliose discreta a moderada com nódulos gliais corticais e degeneração neuronal (66%), que podem aparecer em doenças degenerativas do Sistema Nervoso Central, podem mostrar uma pré-disposição a algumas doenças (ROBBINS; COTRAN 2005). Segundo, Thomson (1995), as causas específicas e os mecanismos de desenvolvimento da degeneração permanecem ainda por ser esclarecidos, embora em seres humanos e animais sejam reconhecidos como transmitidos geneticamente. Portanto, alterações como estas devem ser observadas se estivermos avaliando substância que envolva o sistema nervoso, e faz-se necessário mais estudos para compreender tal achado, assim como no caso de cisto hipofisário observado em 5% dos cães, que são considerados benignos e achados comuns (TAKANASHI et al., 2005), visto que qualquer glândula endócrina pode desenvolver um cisto; contudo, vale lembrar que o cisto pode causar compressão das estruturas interferindo na função da hipófise (ROBBINS; COTRAN 2005). Outra questão que também deve ser levada em conta é

a precisão na análise microscópica, uma vez que os processos de autólise no tecido nervoso iniciam-se precocemente, podendo gerar falsas interpretações durante a análise (THOMSON, 1993; ROBBINS; COTRAN 2005).

Quanto à dermatite encontrada em 34% dos cães, existe grande prevalência de casos dermatológicos em pequenos animais, com uma estimativa de 20 e 75% de todos os animais examinados na prática clínica veterinária apresentam enfermidades do sistema tegumentar como queixa principal ou como doença secundária (CARDOSO et al., 2011), e, ainda, cães submetidos a experimento ficam sob estresse de manipulação, e o tratamento durante o estudo é inviável, por isso vemos uma grande incidência. Além disso, os cães ficam por mais tempo alojados em baias para serem manipulados em estudos aumentando a umidade do local. Porém, deve ser avaliado minuciosamente caso estejam sendo avaliadas drogas de uso tópico.

Ainda, observou-se que 5% dos cães apresentam prolapso bilateral da glândula da terceira pálpebra ou Glândula de Harder, sendo comum à raça Beagle. Um dos fatores que predispõe alteração é a presença de um tecido conjuntivo de suporte laxo e fraco, histologicamente caracteriza-se por uma adenite e existe controvérsia acerca da sua origem ser primária e propiciar a protusão, ou ser secundária ao processo, como descreve Delgado (2005).

Tem se notado a escassez de artigos relacionados à normalização dos parâmetros devido à ausência de padrões mundialmente reconhecidos. A globalização progressiva aprofunda a discussão sobre como desenvolver padrões que possam servir de julgamento dos resultados utilizados na patologia toxicológica. Ter um padrão estabelecido auxilia na avaliação e interpretação dos resultados experimentais feitos nos laboratórios de toxicologia, pelas autoridades de saúde, e agências reguladoras. Dentre os desafios a ser enfrentados pelo patologista toxicológico em âmbito global: obter um profissional altamente qualificado que possa atuar na interpretação e avaliação dos dados, definir critérios de como reconhecer essa competência e desenvolver sistemas de formação e acreditação (ETTLIN et al., 2008).

O desafio do Brasil está em superar uma política industrial competitiva em nível mundial. E, para enfrentar esses desafios precisamos melhorar a política no investimento no P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) no setor farmacêutico nacional,

aprimorar a harmonização e conformidades dos padrões regulatórios nacionais, superar as deficiências dos laboratórios de pesquisa nacionais na área de toxicologia, estabelecer laboratórios acreditados em GLP (Good Practice Laboratory) ou BPL (Boas Práticas de Laboratório) reconhecidos pelo Inmetro (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA) (2011), e estabelecer padrões internacionais aos biotérios para obtenção de creditações internacionais, como a acreditação do AAALAC – Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International que avalia o bem-estar animal, o programa de criação de animais de laboratório, cuidados veterinários, treinamento de pessoal e estrutura física dos biotérios, como sugerem Calixto e Junior (2008); ANVISA (2010); Polack (2010) e AAALAC (2012).

O desenvolvimento da ciência deve estar baseado em uma postura ética frente à necessidade de desenvolvimento da ciência, sendo importante cada vez mais os biotérios adotarem medidas que minimizem o sofrimento animal proporcionando bem-estar. A credibilidade do resultado da pesquisa depende do bem-estar vivenciado pelo animal durante a realização dos testes, da sensibilidade do pesquisador para o entendimento de seus sofrimentos e necessidades, do bom senso nas tomadas de decisão e atitudes, adequada estrutura física e pessoal (FRAJBLAT, 2008; AAALAC, 2012). Há, entretanto, a grande expectativa da comunidade científica de que, no futuro, com a descoberta de novas metodologias e equipamentos, métodos alternativos sejam viáveis e os animais deixem de ser utilizados na atividade científica. E, ainda, que o futuro seja desenvolver modelos animais específicos através da nanotecnologia e genômica, minimizando número de animais utilizados (LANG; HARREL, 2000).

6 CONCLUSÃO

- O cão Beagle quando criado em canis com sob os princípios de BPL (Boas Práticas de Laboratório) e com controles históricos de saúde atualizados auxiliam na geração de dados confiáveis para o estabelecimento de padrões.
- Há necessidade de avaliar a inclusão de novos exames laboratoriais para seleção de animais pré-teste ou em animais que estiverem em um período antes de entrar em estudo, como por exemplo, ultrassonografia, biópsia, cultura e antibiograma, testes ELISA para detecção de antígenos de adenovírus, rotavírus, cinomose, parvovírus, leishmaniose, brucelose canina; microscopia eletrônica para detecção de partículas virais de parvovírus, coronovírus, visando gerar maior confiabilidade nos resultados experimentais, com menor custo.

- Os valores hematológicos e bioquímicos de normalidade, sugeridos para cães Beagle criados em biotério, segundo as condições descritas segue nas tabelas 25 e 26:

Tabela 25 – Valores Hematológicos para o cão Beagle

PARÂMETRO HEMATOLÓGICO	UNIDADE	MÉDIA/DESVIO PADRÃO
Eritrócitos	X10 ⁶ /mm ³	6,28 +- 0,63
Hematócrito	%	42,5 +- 3,89
Hemoglobina	g/dL	13,7 +- 1,6
V.C.M.	fL	69,5 +- 3,37
H.C.M	pg	22,5 +- 2,35
C.H.C.M	%	32,2 +- 2,01
Plaquetas	mm ³	379701 +- 97,958
Leucócitos	mm ³	14933 +- 3.794
Mielócitos	mm ³	0
Metamielócitos	mm ³	0
Bastonetes	mm ³	1
Segmentados	mm ³	9256 +- 2.742
Eosinófilos	mm ³	323 +- 384
Basófilos	mm ³	0
Linfócitos	mm ³	4297 +- 1.738
Monócitos	mm ³	1025 +- 442

Tabela 26 – Valores Bioquímicos para o cão Beagle

PARÂMETRO BIOQUÍMICO	UNIDADE	MÉDIA/DESVIO PADRÃO
Triglicérides	mg/dL	38,9 +- 11,95
Colesterol Total	mg/dL	161,5 +- 36,18
Proteínas Totais	g/dL	5,2 +- 0,54
Albumina	g/dL	2,9 +- 0,39
ALT	UI/L	33,9 +- 7,94
Fosfatase Alcalina	mg/dL	70 +- 12,1
Creatinina	mg/dL	0,5 +- 0,15
Uréia	mg/dL	31,6 +- 6,44
Glicose	mg/dL	97 +- 7,09
Cálcio	mg/dL	11,5 +- 1,29
Cloretos	mEq/L	109,5 +- 10,92
Potássio	mEq/L	4,6 +-0,41
Sódio	mEq/L	137 +- 3,02
Fósforo	mg/dL	8 +- 2,09

- As alterações encontradas na avaliação anatomopatológicas de cães clinicamente saudáveis e suas possíveis causas seguem descritas na tabela 27:

Tabela 27 – Alterações anatomopatológicas em cães saudáveis da raça Beagle

ALTERAÇÃO	Causas possíveis	%
Congestão polivisceral	Eutanásia	100
Congestão e petéquias tímicas	Eutanásia	39
Congestão e edema pulmonar	Eutanásia	71
Hepatomegalia	Eutanásia	26
Congestão hepática e degeneração hidrópica difusa	Eutanásia	45
Enterite catarral crônica (atrófica ou não)	Estresse	100
Hiperplasia de placas de Peyer	Estresse /Vacinal	97
Linfoadenomegalia mesentérica	Estresse/Vacinal	100
Gastrite crônica com ou sem hiperplasia linfóide	Estresse	58
Microcistos renais corticais	Achado de necrópsia	58
Dermatite crônica com lesões papulo-crostosas	Manejo	34
Prolapso bilateral da glândula da terceira pálpebra e blefarite crônica	Comum à raça	5

- Os valores de peso de órgão encontrados para a raça Beagle segue nas tabelas 28 e 29:

Tabela 28 – Valor de peso de órgão de cães machos para raça Beagle

MACHOS

PARÂMETRO MACHO	MÉDIA/ DESVIO PADRÃO
PESO CORPORAL (Kg)	10,777 +- 1,375
CORAÇÃO (g)	90,794 +- 10,854
CORAÇÃO RELATIVO (g)	8,457 +- 0,586
FÍGADO (g)	430,983 +- 76,121
FÍGADO RELATIVO (g)	39,807 +- 3,527
RINS (g)	69,600 +- 10,699
RINS RELATIVO (g)	6,454 +- 0,488
ADRENAIS (g)	1,383 +- 0,354
ADRENAIS RELATIVO (g)	0,127 +- 0,038
TIREÓIDE (g)	1,075 +- 0,255
TIREÓIDE RELATIVO (g)	0,098 +- 0,019
TIMO (g)	16,822 +- 4,665
TIMO RELATIVO (g)	1,817 +- 0,652
BAÇO (g)	57,811 +- 20,334
BAÇO RELATIVO (g)	6,299 +- 2,812
CÉREBRO (g)	79,400 +- 7,568
CÉREBRO RELATIVO (g)	8,538 +- 1,866

PARÂMETRO REPRODUTIVO MACHO	MÉDIA/DESVIO PADRÃO
PESO CORPORAL (Kg)	10,778 +- 1,375
TESTÍCULO+EPIDIDIMO (g)	22,733 +- 3,600
TESTÍCULO+EPIDIDIMO RELATIVO (g)	2,443 +- 0,613

Tabela 29 – Valor de peso de órgão de cães fêmea para raça Beagle

FÊMEAS

PARÂMETRO FÊMEA	MÉDIA/ DESVIO PADRÃO
PESO CORPORAL (Kg)	9,7556 +- 1,615
CORAÇÃO (g)	81,606 +- 13,855
CORAÇÃO RELATIVO (g)	8,399 +- 0,809
FÍGADO (g)	451,544 +- 110,350
FÍGADO RELATIVO (g)	45,992 +- 6,341
RINS (g)	61,167 +- 9,354
RINS RELATIVO (g)	6,316 +- 0,656
ADRENAIS (g)	1,394 +- 0,275
ADRENAIS RELATIVO (g)	0,147 +- 0,034
TIREÓIDE (g)	0,962 +- 0,334
TIREÓIDE RELATIVO (g)	0,103 +- 0,031
TIMO (g)	14,972 +- 3,941
TIMO RELATIVO (g)	1,427 +- 0,768
BAÇO (g)	43,283 +- 13,940
BAÇO RELATIVO (g)	4,263 +- 2,313
CÉREBRO (g)	77,227 +- 6,365
CÉREBRO RELATIVO (g)	7,454 +- 3,543

PARÂMETRO REPRODUTIVO FÊMEA	MÉDIA/DESVIO PADRÃO
PESO CORPORAL (Kg)	9,756 +- 1,615
ÚTERO (g)	9,038 +- 8,490
ÚTERO RELATIVO (g)	0,956 +- 0,867
OVÁRIO (g)	1,688 +- 0,591
OVÁRIO RELATIVO (g)	0,181 +- 0,053

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Notou-se escassez ou ausência de artigos relacionados à normalização dos parâmetros devido à ausência de padrões mundialmente reconhecidos; bem como ausência de parâmetros fisiológicos para raça Beagle criada no Brasil, sendo este o primeiro trabalho com este perfil.

O cão da raça Beagle é o mais utilizado em investigações toxicológicas e demais áreas da Biociência. O desafio atual é aprimorar o padrão de qualidade desses cães. O Brasil necessita de obter cães com qualidade e padronizados para gerar dados com mais confiabilidade e segurança. É preciso superar as deficiências dos laboratórios de pesquisa nacional na área de toxicologia e demais áreas afins, estabelecer laboratórios creditados em BPL e biotérios com padrões internacionais sugeridos por órgãos internacionais de bem-estar animal, como AAALAC – Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care. O futuro se faz por mudanças de mentalidade e ação contínua que aprimorem a forma como se faz pesquisa no Brasil. Aprender com países que já desenvolvem essas questões há anos nos dá subsídio para desenvolver nossa forma de fazer ciência. O mercado farmacêutico mundial e nacional crescente exige cada vez mais competência e excelência nas atividades desenvolvidas, portanto, o futuro é agora, e faz-se necessário o fortalecimento e ampliação da capacitação tecnológica e de pessoal, fortalecer as redes de laboratórios públicos e privados, estabelecer e estreitar parcerias público-privadas visando à consolidação do sistema nacional de ciência e saúde.

REFERÊNCIAS

AAALAC - Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care. **Position Statements**. 20012. <<http://www.aaalac.org/accreditation/positionstatements.cfm>> Acesso em: 12 fev. 2012.

ALEMÁN, C. L.; MÁS, R.; RODEIRO, J.; MESA, R. ; MENÉNDEZ, R.; GÁMEZ, R. HERNÁNDEZ, C. Reference data for the principal physiological indicators in three species of laboratoy animals. **Laboratory Animals**, v. 34, p. 379-385, 2000.

ALVES, G. J.; VISMARI, L.; FLORIO, J. C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. **Neuroscience Research**, v. 56, n. 2, p.172-179. 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos**. Brasília: Gerência de Segurança e Eficácia – GESEF, 2010.

ANISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Pesquisa Clínica**. 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>> Acesso em: 15 fev. 2012.

BAYNE, K. A. Environmental Enrichment of Nonhuman Primates, Dogs and Rabbits Used in Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 3, n. 1, p. 132-137, 2003.

BACKER, D. C. Diagnosis of disorders of hemostasis. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WIESER, G. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2004. cap.14, p. 179-196,

BATE, M. The dog as an experimental animal. Animal Welfare Officer. University of Newcastle. **ANZCCART News**, v.10, n. 01, 1997.

BAUMANS, V. Enviromental enrichment for laboratory rodents and rabbits, requirements of rodents, rabbits and research. **ILAR Journal**, v. 46, n. 2, 2005.

BEAVER, B. V. **Canine behavior**: insights and answers. Falta local: W.B. Saunders Company. 2008. 315 p.

BECK, C.; ARAÚJO, F. A. P.; OLICHESKI, A. T.; BREYER, A. S. Frequência de infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo método de Faust e Cols. (1993) e pela coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, 2005.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; VRIES, H. W.; MOL, J. A. Behavioural and hormonal indication of enduring environmental stress in dogs. **Animal Welfare**, v. 9, p. 49-62, 1999.

BIONDO, A. W. **Interpretação do leucograma de estresse**. In: ANAIS do II SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2., 2005, Rio Grande do Sul, 2005. 91 p.

BRASIL - Ministério da Justiça. Ministério da Saúde. Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ministério da Ciência e Tecnologia. Ministério do Meio Ambiente. **Lei Arouca Nº 11.794. Regulamento o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal estabelece uso científico de animais**. Brasília, 2008.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 01/88. Normas de pesquisa em saúde**. Brasília, 1988.

BLOOM, J. C. Principles of hematotoxicology laboratory assessment and interpretation data. **Toxicologic Pathology**, v. 21, n. 2, p. 45-48, 1993.

BUDZIAK, C. **Avaliação dos perfis clínicos e laboratorial de cães de abrigo submetidos à ovariectomia e orquiectomia**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciência Agrárias e Ambientais, PUC, Paraná, 2010.

BUSH, B. M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para clínicos de Pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. 384 p.

CALIXTO, J. B.; JUNIOR, J. M. S. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78 p. 98-106, 2008. Suplemento 98.

CAPANEMA, L. X. L. Panorama de serviços de testes pré-clínicos no Brasil. **BNDES Setorial**, n. 29, 2009.

CARDOSO, M. J. L.; MACAHDO, L. H. A.; MELUSSI, M.; ZAMARIAN, T. P.; CARNIELLI, C.; JUNIOR, J. C. M. F. Dermatopatias em cães: revisão de 257 casos. **Archives Veterinary Science.**, v. 16, n. 2, p. 66-74, 2011.

CARREGARO, A. B.; CASTRO, M. B.; MARTINS, F. S. Estudo da ação inflamatória aguda do tiopental intraperitoneal em ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, 2005.

CASTRO, M. B.; DEVELEY, F. F.; AZARIAS, R. E. G. R.; MOURÃO, G. B.; MARCOS, H. R. D.; BARBOSA, A. M. L.; GONÇALVES, P. P.; CAETANO, F. A. M.; PEREIRA, C. L. Achados clínicos, gastrocópicos e histopatológicos em cães (*Canis familiaris*) tratados com meloxicam (Metacam®). **ARS Veterinária**, v. 5, n. 3, p. 154-159. 1999.

CBKC. CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFILIA. **Padrão oficial da raça Beagle**. Confederação Brasileira de Cinofilia. 2000. Disponível em: <<http://www.cbkc.com.br/padroes/pdf/grupo6/beagle.pdf>> Acesso em: 13 abr. 2012.

CHOI, S.; HWANG, I.; HWANG, D.; KANG, H. Basic data on the hematology, serum biochemistry, urology, and organ weights of beagle dogs. **Laboratory Animal Research**, v. 27, n. 4, p. 283-291, 2011.

CLAUSING, P. Enrichment, welfare and animal housing – Happy animals make a good science when does environmental enrichment and meke animals happy? In: FELASA SYMPOSIUM INTERNATIONALISATION AND HARMONIZATION OF LABORATORY ANIMAL CARE AND USE ISSUES, 9., falta data de realização do evento, London. **Prodeedings...** Edited Malcolm R Gamble, 2004. 168 p.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; SALLIS, L. S.; ANTUNES, T. A.; MATTEI, A.; RODRIGUES, M. R.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Toxicidade Pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (orégano) em ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 704-709, 2008.

CRISSMAN, J. W.; GOODMAN, D. G.; HILDEBRANDT, P. K.; MARONPOT, R. R.; PRATER, D. A.; RILEY, J. H.; SEAMAN, W. J.; THAKE, D. C. Best practice guideline toxicologic histopathology. **Toxicologic Pathology**, v. 32, p. 126-131, 2004.

COMBES, R. D. A. Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals Under the European Union REACH System. **ATLA**, v. 32, p. 163–208, 2004.

COSTA, P.; LOPES, M. A. F.; COSTA, M. C.; JÚNIOR, L. O. L. Biópsia hepática videolaparoscópica em cães. **Revista Ceres**, v. 52, n. 503, p. 763-770, 2005.

CUNNINGHAM, A. A. Disease risks of wildlife e translocations. In: FLEISHMAN, E. **Conservation biology**. Londres, 1996. v. 10, p. 353.

DAVIES, B.; MORRIS, T. Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans Pharmaceutical Research, **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 7, p. 1093-1095, 1993.

DELGADO, E. Recolocação cirúrgica da glândula de nictante em canídeos pela técnica de bolsa conjuntival – 23 casos clínicos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.100, p. 553-554, 2005.

DERELANKO, M. J.; HOLLINGER, M. A. **Handbook of Toxicology**. 2. ed., 2002. p. 759

DOMINGOS, T. C. S.; SALOMÃO, M. C. Meios de diagnóstico das principais afecções testiculares em cães: risão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 393-399, 2011.

DUKES, H. H. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996. p. 19-43.

EMEA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Summary Report – Thiopental Sodium**. London: Committee for Veterinary Medicinal Products, 1999. p. 4. EMEA/MRL/708/99.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **ICH – Topici E6(R1) Guideline for Good Clinical Practice**. London: Committee for Veterinary Medicinal Products, 1997. p. 48.

ERDOGAN, N. Y.; HUTEN, O. N.; BAHADIR, F.; SANDER, E. Diffuse and psammomatous calcification in intestinal type gastric carcinoma: Report of two cases with literature review. Department of Pathology, Zonguldak Gynecology-Obstetrics and Pediatrics Hospital, Zonguldak Departments of Pathology and Gastroenterology Istanbul Educational Hospital Istanbul. **Turky Jornal Gastroenterology**, v. 22, n. 4, p. 414-418, 2011.

ETTLIN, R. A.; BOLON, B.; PYRAH, I.; KONISHI, Y.; BLACK, H. E. Global recognition of qualified toxicologic pathologists: where are now and where we need to go. **Toxicologic Pathology**, v. 36, p. 753-759, 2008.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 59-65, 2004.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S.R.G.; BERNARDI, M.M. Anestésicos intravenosos e outros parenterais. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 11, p. 114-124.

FERNANDES, S. C.; COUTINHO, S. D. Traqueobronquite infecciosa canina – revisão. **Revista do Instituto de Ciência e Saúde**, v. 22, n. 4, p. 279-285, 2004.

FERREIRA, L. N. Esplenomegalia com acentuada leucocitose em decorrência de piometra. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16., 2007, Pelotas. **Anais...** 2007. 5 p.

FIOCRUZ. O complexo econômico-industrial da saúde (CEIS). Boletim Informativo do Grupo de Pesquisas de Inovação em Saúde da ENSP/VPPIS/FIOCRUZ, **Informe CEIS**, v. 1, n. 1, p. 1-17, 2010.

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V. L. L.; RIVERA, E. A. B. Ciência em Animais de Laboratório. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 44-46, 2008.

GOLDIM, J. R. A avaliação ética da investigação científica de novas drogas: a importância da caracterização adequada das fases da pesquisa. **Revista HCPA**, v. 27, n. 1, 2007.

GOMES, A.; PARRA, B. S.; FRANCO, F. O.; BASILE, L.; JOSÉ, L. T.; ROMERO, V. L. Exame da função hepática na Medicina Veterinária. **Revista Científica eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, 2008.

GONZÁLEZ, F.H. D.; CARVALHO, V.; MOLLER, V. A.; DUARTE, F. R. Perfil bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de porto alegre. Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**, v. 29, n.1, p.1-6, 2001.

GRAHAM, R.; TYLER, L. O.; KROL, W. L.; SILVER, I. S.; WEBSTER, L. O.; CLARK, P.; CHEN, L.; BANKS, T.; LECLUYSE, E. L. Temporal kinetics and concentration response relationships for induction of CYP1A, CYP2B and CYP3A in primary cultures of beagle dogs hepatocytes. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 20, n. 2, p. 69-78, 2006.

HOTTENDORF, G. H.; HIRTH, R. S. Lesions of spontaneous subclinical disease in beagle dogs. **Veterinary Pathology**, v. 11, p. 240, 1974.

HENNEMANN, C. R. A.; CUNHA C. M. S.; LOPES, S. T. A.; AMARAL, A. S.; POLYDORO, A. S. Avaliação da função renal através da densidade urinária e dosagem sérica e creatinina na aflatoxicose experimental em cães. **Ciência Rural**, v. 26, n. 1, p. 97-102, 1996.

HUBRECHT, R. Comfortable Quarters for Dogs in Research Institutions. **Universities Federation for Animal Welfare - UFAW**. 2002. Disponível em: <<http://labanimals.awionline.org/pubs/cq02/Cq-dogs.html>> Acesso em: 09 mar. 2012.

ILAR. INSTITUTE LABORATORY ANIMAL RESEARCH. **Laboratory Animal Management: Dogs**. 1994. Disponível em: <http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=2120&page=6> Acesso em: 13 mar. 2012.

ILAR. **INSTITUTE LABORATORY ANIMAL RESEARCH**. Definition of Pain and Distress and Reporting Requirements for Laboratory Animals: Proceeding of the workshop Held. **Institute Laboratory Animal Research - ILAR**. National Academy Press. 2000.

IMS. O que foi consultado neste site????? 2011. Disponível em: <<http://www.imshealth.com/portal/site/ims/menuitem.d.>> Acesso em: 15 fev. 2012.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Princípios das boas práticas de laboratório – BPL – norma DIT-DICLA- 035**. 2. rev. INMETRO, 2011. p. 1-19.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Princípios das Boas Práticas de Laboratório – BPL - NIT-DICLA 035**. Inmetro, 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Dicla/NIT/NIT-Dicla-35_02.pdf> Acesso em: 12/03/2012.

JANNINI, D. S.; OLIVEIRA, I. R. S.; WIDMAN, A.; IANHEZ, L. E.; CERRI, G. G. Aspectos morfológicos e hemodinâmicos do baço em indivíduos normais: estudo por ultras-son doppler. **Radiologia Brasileira**, v.36, n.4, 2003.

JENNINGS, M. LASA Guidance on rehoming laboratory dogs. Resarch Animals Department. In: FELASA SYMPOSIUM INTERNATIONALISATION AND HARMONIZATION OF LABORATORY ANIMAL CARE AND USE ISSUES, 9., falta data de realização do evento, London. **Prodeedings....**: Edited Malcolm R Gamble, 2004. 168p.

KAMIMURA, H. Genetic polymorphism of cytochrome P450s in beagle: possible influence of CYP1A2 deficiency on toxicological evaluations. **Archive Toxicological**, v. 80, p. 732-738, 2006.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. New York: Academic Press, 1997. p. 885-905.

KANTEK, C. E. **Manual de hematologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2005. 206 p.

KITAMURA, E. A. **Perfis hematológico, hepático, lipídico e lipoprotéico de cães (Canis familiaris) com doença hepática**. 2008. 128 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista – UNESP,- Botucatu, 2008.

KYROU, I.; CHROUSOS, G. P.; TSIGOS, C. Stress, visceral obesity and metabolic complications. **Animals of the New Yourk Academy of Science**, v. 1083, p. 77-110, 2006.

LANG, M.; HARREL, G. T. Laboratory animal science in the future: a vision. **Scandinavian Journal Laboratory Animal Science**, v. 27, n. 3, p. 1-7, 2000.

LANIS, A. B.; FONSECA, L. A.; ROESLER, T.; ALVES, A.; LOPES, B. Avaliação laboratorial das doenças renais em pequenos animais. **Pubvet**, v. 2, n. 28, 2008.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G.; KO, G. M. **Cuidados e menjo de animais de laboratório**. Editora Atheneu. 2010. 708 p.

LIMA, W. T. Entendimento humano da experimentação animal. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, 2008.

LOPES, P. C. F. **Infusão contínua de profofol ou tiopental em cães portadores de hipertensão pulmonar induzida pela serotonina**. 2009. 231 f. Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, 2009.

LUCEY, B. C.; STUHLFAUT, J. W.; SOTO, J. A. Mesenteric lymph nodes seen at imaging: causes na significance. **Radiographs**, v. 25, p. 351-365, 2005.

MACHADO, C.; FILIPECKI, A. T. P.; TEIXEIRA, M. O.; KLEIN, H. E. A regulação do uso de animais no Brasil do século XX e o processo de formação do atual regime aplicado à pesquisa biomédica. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 17, n. 1, p. 87-105, 2010.

Mc TAVISH, S. Eosinophilic gastroenteritis in dog. **The Canadian Journal**, v. 43, n. 6, p. 463-465, 2002.

MEINKOTH, J. H.; CLINKENBEARD, K. D. Normal hematology of the dog. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2000. p. 1057-1063.

MELCHERT, A.; MOTTA, Y. P.; GIUFFRIDA, R. LAPOSY, C. B. Avaliação citológica e microbiológica do lavado broncoalveolar em cães hígidos. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 157-164, 2008.

MENDONÇA, A. **Avaliação do perfil hemostático, hematológicos e bioquímico de cães com doença hepática**. 2004. 61 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2004.

METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 39, n. 4, p. 515-521, 2006. Simpósio: Farmacogenética. Cap. I.

MONTENEGRO, G. E. S.; AMARAL, C. M. R.V.; ARAÚJO, I. R. M.; LIMA, J. Y. B.; NOGUEIRA, M. A. A.; SANTOS, N. L. T.; SANTOS, W. P. P.; NEVES, A. K. R. Relato de caso: características clínicas, hematológicas e antopatológicas em um cão com leptospirose. In: X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10., 2010, Pernambuco.; UFRPE, 2010.

MORTON, D.; SELLERS, R. S.; BARALE-THOMAS, E.; BOLON, B.; GEORGE, C.; HARDISTY, J. F.; IRIZARRY, A. Recommendation for pathology peer review. **Toxicologic Pathology**, v. 38, p. 118-1127, 2010.

MORTON, D.; KEMP, R. K.; FRANCKE-CARROLL, S.; JENSEN, K.; MCCARTNEY, J.; MONTICELLO, T. M.; PERRY, R.; PULIDO, O.; ROOME, N.; SCHAFER, K.; SELLERS, R.; SNYDER, P. W. Best practices for reporting pathology interpretations within GLP toxicology studies. **Toxicologic Pathology**, v. 34, p. 806-809, 2006.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT . **OECD 409 - Guideline For Testing of Chemicals - Repeated dose 90-day toxicity in No-Rodents**. 1998. p. 1-9.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. O.; SOUZA, W. R. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behavior Immunity**, v. 17, n. 1, p. 43-54, 2003.

POLLACK, E. Estudos pré-clínicos: visões e propostas para evolução do setor no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE INOVAÇÃO EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS. 4., 2010, São Paulo. 2010.

POLITI, F. A. S.; MAJEROWICZ, J.; CARDOSO, T. A. O.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Revista Ciências Farmacêuticas Aplicada**, v. 29, n. 1, 2008.

PIGNONE, V. N.; CONTESENI, E. A.; PINTO; A.T.; OLIVEIRA, R. Diagnóstico Diferencial de afecções das glândulas salivares em cães e gatos. Anais do XI Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v.3, n.6, p. 242-245, 2010.

REINHARDT, D. T. **Variables, refinement and environmental enrichment for rodents and rabbits kept in research institutions**. Animal Welfare Institute, 2005. 71 p.

ROBBINS & COTRAN, K. A. F. **Patologia**: bases farmacológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005. 1592 p.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. Johns Hopkins University. 2012. Disponível em: <http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc> Acesso em: 01 mar. 2012.

SANTARÉM, V. A.; JOSÉ, M. D.; LAPOSY, C. B. Alterações bioquímicas em cães citopênicos e não citopênicos com ehrlichiose. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 845-852, 2008.

SELLERS, R. S.; MORTON, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; YANO, B. L.; PERRY, R.; SCHAFER, K. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 751–755, 2007.

SCHAPIRO, S. J.; EVERITT, J. J. Preparation of Animals for Use in the Laboratory: Issues and Challenges for the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). **ILAR Journal**, v.47, n. 4, 2011.

SCHMIDT, C.; DEVELEY, F. F.; AZARIAS, R. E. G. R.; MOURÃO, G. B.; MARCOS, H. R. D.; BARBOSA, A. M. L.; GONÇALVES, P. P.; CAETANO, F. A. M.; PEREIRA, C. L. Perfil lipoprotéico de candelas submetidas à ovário-histerectomia com ou sem reposição estrogênica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, 2004.

SCHNAIDER, A.; SILVA, P. C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 4, 2004.

SCHNAIDER, T. B.; SOUZA, C. Aspectos éticos na experimentação animal. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 53, n. 2, p. 278-285, 2003.

SILVA, M. C. **Estudo retrospectivo das lesões hepáticas crônicas em cães**. 2005. f.161. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Santa Maria, 2005.

SILVA, R.; ALMEIDA JÚNIOR, G.; CURY, S.; MARTINELLI, J. R.; AMARAL, J. B.; PERENHA, R. A.; LOCATELLI, L.; MATIAS, V. Leucograma de estresse. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 11, p. 1679-7353, 2008.

SPINOSA, S. H.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. falta local: Editora Manole, 2008. cap. 3.

TAKANASHI, J.; BARKOVICH, J. A.; SAEKI, N.; KOHNO, Y. Cistos da hipófise na infância avaliada por ressonância magnética. **American Journal of Neuroradiology**, v. 26, p. 2144-2147, 2005.

TAKEMURA, L. S.; AMUDE, A. M.; CAMARGO, P. L.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Detecção e efeitos de *Helicobacter* spp. em cães saudáveis e com sinais de gastrite. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 408-480, 2007. Suplemento 2.

TIAN, Y.; LI, R.; ZHANG, Z.; CHENG, X. Investigation on the reference values of serum biochemistry in normal beagle dogs. **Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 5, n. 1, p. 45-48, 2004.

THOMÉ, H. E. **Avaliação histopatológica e caracterização morfométrica testicular e epididimária em cães adultos sem raça definida (SRD)**. 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2006.

THOMSON, R. G. **Patologia geral veterinária**. Guanabara. 1993, 411p.

VERWER, C. M.; HENDRISKSEN, L.F.M. **Effects of housing condition on experimental outcome in a toxicological study**. Department of Animals. Science & Society. In: FELASA SYMPOSIUM INTERNATIONALISATION AND HARMONIZATION OF LABORATORY ANIMAL CARE AND USE ISSUES, 9., falta data de realização do evento, London. **Proceedings...** Edited Malcolm R Gamble, 2004. 168p.