

ESTUDOS ENVOLVENDO RESTRIÇÃO DE ALIMENTO E ÁGUA EM ROEDORES

Pode ser necessário regular alimento ou líquido para a condução de alguns protocolos de pesquisa comportamental, fisiológica e de neurociências. Os processos de regulação podem exigir o acesso programado ao alimento ou água, de modo que um animal consuma tanto quanto desejado em intervalos regulares, ou acesso restrito, no qual o volume total de alimento ou líquido consumido é estritamente monitorado e controlado. O objetivo, quando esses estudos estão sendo planejados e executados, deve ser o de usar a menor restrição necessária para alcançar o objetivo científico ao mesmo tempo em que se mantém o bem-estar animal (NRC, 2014). Dessa forma, é importante que o pesquisador justifique o período de tempo utilizado para restrição severa e o método para o consumo regulado. A duração do jejum precisa ser justificada em um contexto científico específico da espécie, condição fisiológica e de saúde dos animais envolvidos, o que não se justificaria para o uso no ensino. Para o uso científico, portanto, qualquer período de privação de alimento proposto para o animal deve ser avaliado cuidadosamente quando submetido à apreciação da CEUA (RN 33/2016, CONCEA).

Em revisão sobre o tema jejum em pesquisas com roedores, considerando o bem-estar animal, Rowland (2007) formulou as seguintes considerações: “Os investigadores devem sempre utilizar o período mais curto de privação consistente com os objetivos do estudo. A privação de alimentos em múltiplos de 24 horas é cientificamente a mais defensável porque as variáveis circadianas são minimizadas. A privação de alimentos por 24 horas leva a menos de 10% de perda de peso na maioria das espécies, o que de maneira geral é aceitável. Períodos mais longos precisam de justificativa e revisão cuidadosa, incluindo um protocolo de vigilância diária e pontos finais. Como a privação ou restrição de alimentos e líquidos ocorreu no passado evolutivo de todas as espécies terrestres existentes, os animais estão fisiologicamente bem equipados para lidar com essas privações. Após 12 a 24 horas sem acesso, os animais reduzem eficientemente mais perdas de fluidos ou energia por uma combinação de ajustes comportamentais e fisiológicos. Estes ajustes presumivelmente minimizam o estresse fisiológico ou psicológico adicional da privação. Além disso, os animais têm ritmos endógenos que os tornam particularmente adaptáveis a ocorrências uma vez por dia, como acesso a alimentos ou água. Portanto, privações de 24 horas e horários de acesso restrito uma vez por dia parecem ser minimamente estressantes pelos parâmetros de comportamento e aparência normais”.

Por outro lado, uma redução aguda de ingestão hídrica, por 24 horas, pode resultar em perda de mais de 15% de peso corpóreo, sede, seca das membranas da mucosa, produção reduzida de urina, redução de consumo alimentar, perda da elasticidade da pele, letargia, choque e colapso cardiovascular. Portanto, uma privação de água acima de 24 horas não deve ser aceita para camundongos, devido a rápida deterioração da condição do animal. Já, um protocolo de restrição crônica de água (em torno de 50% da ingestão ad libitum) pode ser imposta por intervalos de até 8 dias. A desidratação é uma complicação comum que pode não ser reconhecida facilmente em seu estágio inicial sem um monitoramento cuidadoso e funcionários capacitados. Os animais devem ser monitorados de perto para garantir que a ingestão de comida e líquidos atenda às suas necessidades nutricionais. É importante notar que a restrição de água irá simultaneamente causar uma menor ingestão de alimento e vice-

versa. O peso corporal deve ser registrado pelo menos uma vez por semana e com mais frequência em animais submetidos a restrições severas. Registros escritos devem ser mantidos para cada animal para documentar o seu consumo diário, condição de hidratação e quaisquer alterações clínicas ou de comportamento usados como critério para a remoção temporária ou permanente do animal do protocolo (NRC, 2014). O pesquisador deve descrever no protocolo de pesquisa submetido à CEUA, quais serão os critérios objetivos que serão usados para estabelecer a remoção permanente ou temporária do animal da pesquisa.

Para auxiliar no estabelecimento de critérios objetivos e procedimentos para execução de protocolos envolvendo restrição hídrica e alimentar, sintetizamos orientações básicas, contidas em protocolos institucionais, como IACUC e AALAC.

Procedimentos

1. O peso corporal inicial do (s) animal (es) deve (m) ser medido antes da restrição de alimentos ou água.
2. No caso de animais jovens em crescimento (<21 dias) a perda de peso corporal deve ser ajustada ao ganho de peso corporal normal de um animal de mesma idade e sexo. Estudos de restrição alimentar severa não devem ser iniciados até que os roedores tenham pelo menos 14 semanas de idade;
3. A restrição deve basear-se num parâmetro mensurável, tal como a percentagem de ingestão ad libitum ou a duração da restrição.
4. No caso de protocolos de pesquisa de resposta condicionada, recomenda-se a utilização de um alimento ou fluido altamente preferido como reforço positivo em vez de restrição.
5. O peso corporal deve ser medido uma vez por semana em todos os animais que estejam em restrição de alimento ou água que sofreram perda de $\leq 7\%$ do peso corporal.
6. O peso corporal deve ser medido 2-3 vezes por semana para animais que tenham perdido $> 7\%$ do peso corporal.
7. Para animais com restrição alimentar durante toda a vida, tais como a manutenção de 85% do peso corporal, os mesmos devem ser pesados 2-3 vezes por semana durante o primeiro mês de estudo para garantir o patamar de perda de peso e, em seguida, devem ser pesados uma vez por semana.
8. Os animais privados de água devem ser monitorizados pelo menos diariamente, incluindo finais-de-semana e feriados; O turgor da pele deve ser utilizado para avaliar o estado de hidratação. O tempo prolongado de retorno da pele ao normal após o seu pinçamento indica 6% a 7% de desidratação.
9. Os pontos finais, os sintomas clínicos e as condições para a remoção temporária ou permanente de um animal do estudo devem ser descritos. Os parâmetros para remoção do animal devem incluir:

A. Perda de peso corporal superior a 15%: Um animal não pode perder mais de 15% do seu peso inicial durante um estudo de restrição alimentar.

B. Aparência (olhos afundados, escore de condição corporal de 2 ou 1 de escore de 5)

C. Comportamento (indiferente, letárgico)

D) Outros problemas de saúde

E. Falha no crescimento de animais para ganhar peso

10. Para a restrição alimentar: um roedor não pode perder mais de 20% do peso corporal quando comparado a animal de mesma idade e sexo. Depois de 20% de perda de peso ter sido alcançada (o peso do animal é de 80% do peso inicial ou controles correspondentes), deve ser introduzido suplemento alimentar diário para evitar a perda de peso adicional. A restrição não pode ser tentada novamente até que o animal pese pelo menos 80% do seu peso original.

11. Para restrição de fluidos: os roedores com regulação / programação de fluidos com uma perda de peso de 10% do peso basal são considerados clinicamente desidratados e devem ser autorizados a beber água livremente sem interrupção. Adicionalmente, devem ser administrados 0,5-1 ml (camundongo) ou 2-3 ml (rato) de solução de ringer lactato subcutâneo ou solução salina isotônica (NaCl a 0,9%) e o médico veterinário responsável deverá ser consultado.

12. O médico veterinário responsável e /ou membros da CEUA têm o direito de solicitar as anotações de acompanhamento de peso, etc., para revisão a qualquer momento.

Programação para restrição alimentar durante 24 horas:

Os roedores recebem acesso ad libitum ao alimento pelo menos uma vez a cada 24 horas durante pelo menos uma hora. Após a conclusão da sessão de estudo, o roedor é devolvido à gaiola com comida e água ad libitum. A sessão é documentada em formulário e o peso corporal é verificado e documentado semanalmente. Durante as primeiras 1-2 semanas de um estudo os animais devem ser pesados e o peso documentado três (3) vezes por semana.

Os animais devem receber suplemento alimentar sempre que forem observados os seguintes sinais clínicos:

1. Nenhuma saída fecal por > 24 horas. Existem poucas ou nenhuma pastilha fecal.

2. Perda de peso corporal de > 10% em 7 dias ou > 20% em > duas semanas.

3. Os roedores em estudos de restrição alimentar devem ser pesados 3x/semana durante o período de aclimação; Pelo menos semanalmente, a menos que a condição do animal justifique um monitoramento mais frequente do peso corporal.

4. Depois que o animal atingiu 80% do peso corporal de um controle de mesma idade e sexo, deve-se fornecer alimento suficiente para mantê-lo neste peso e não perder mais peso.

5. Escore de condição corporal <2

6. O animal está apático e inativo.

Definições utilizadas nesse guia:

Alimentos ou restrição de fluidos: qualquer desvio das práticas de criação (isto é, acesso à água e ração ad libitum). Isso exclui certas situações clínicas sob a direção do veterinário, tais como dietas alteradas que não envolvem restrição (dieta alta / baixa gordura, alimentos / água medicamentos, etc.).

Turgor da pele: grau de elasticidade na pele. A pele que perde a elasticidade e não retorna ao normal ou retorna muito lentamente após ser pinçada, indica níveis de desidratação.

Referências:

Bekkevold, C.M.; Robertson, K.L.; Reinhard, M.K.; Battles, A.H.; Rowland, N.E. Dehydration Parameters and Standards for Laboratory Mice. **J Am Assoc Lab Anim Sci.** 2013 May; 52(3): 233–239.

BRASIL. **Normativas do CONCEA para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em atividades de ensino ou pesquisa científica.** E-book, 3ª edição- CONCEA, 2016.

IACUC - Institutional Animal Care and Use Committee. **Food Regulation and Restriction in Rodents.** *Approved March 2009, Revised 2014.*

<http://www.bu.edu/researchsupport/compliance/animal-care/working-with-animals/food-regulation-and-restriction-in-rodents/>

Rowland, N.E. Overviews Food or Fluid Restriction in Common Laboratory Animals: Balancing Welfare Considerations with Scientific Inquiry . **Comparative Medicine**, Vol 57, No 2 April 2007.