

Marcelo Renato Massahud Júnior
Geraldo Magela Salomé

Protocolo de Cirurgia Experimental de Ferida Cirúrgica em Ratos

UNIVÁS
2016

Massahud Junior, Marcelo Renato (Coord.).

Cirurgia experimental em ferida cirúrgica em ratos: protocolo / coordenação de Marcelo Renato Massahud Júnior e Geraldo Magela Salomé; colaboração de Margarida Maria de Carvalho Resende, Diego Guimarães Openheimer e Wellington Delfino. – Pouso Alegre: UNIVÁS, 2016.

27f. : il.

ISBN: 978-85-67647-17-3

1. Ratos Wistar. 2. Procedimentos. 3. Cirurgia experimental. I. Salomé, Geraldo Magela (Coord.). II. Rezende, Margarida Maria de Carvalho (Colab.). II. Openheimer, Diego Guimarães (Colab.). III. Delfino, Wellington (Colab.). IV. Título

Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVÁS)
Mestrado Profissional em Ciências
Aplicadas à Saúde

Protocolo de Cirurgia Experimental em Ferida Cirúrgica em Ratos

Marcelo Renato Massahud Júnior
(Coord.)
Geraldo Magela Salomé
(Coord.)

Pouso Alegre, MG
2016

Criação e Informação

Marcelo Renato Massahud Júnior – Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVÁS) - Pouso Alegre, MG

Equipe de Elaboração

Marcelo Renato Massahud Júnior (discente)
Prof. Dr. Geraldo Magela Salomé (orientador)
Margarida Maria de Carvalho Resende (colaboradora)
Diego Guimarães Openheimer (colaborador)
Wellington Delfino (colaborador)
Lydia Massako Ferreira (colaboradora)

Projeto Gráfico e Diagramação

Cíntia Ferreira

Revisão

Antônia Cileide Pereira

Impressão

Gráfica Amaral Editora

Tiragem: 100 exemplares

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução total ou parcial desta obra, desde que citada a fonte, que não seja para qualquer fim comercial e que haja autorização prévia, por escrito, do autor. Distribuição gratuita.

Sumário

Prefácio	06
1. Apresentação	08
2. Introdução	10
3. Importância do Condicionamento dos Animais	13
4. Quando e Por Que utilizar Animais em Pesquisas	16
5. Procedimentos Gerais para Cirurgias Experimentais	16
5.1. Acomodações dos Ratos	16
5.2. Condicionamento dos Ratos	17
6. Procedimento Cirúrgico	18
6.1. Técnica Anestésica	18
6.2. Epilação dos Ratos	19
6.3. Demarcação com Punch	19
6.4. Confeção da Ferida Cirúrgica	20
7. Técnica de Curativo em Ratos	22
7.1. Higienização	22
7.2. Aplicação da Cobertura na Ferida	23
7.2.1. Cobertura com Filme	23
8. Eutanásia dos Animais	24
9. Descarte dos Animais	26
10. Bibliografia	27

Prefácio

A construção de protocolos validados cientificamente, respeitando os fatores técnicos de biossegurança e os princípios da bioética, é requisito fundamental para o desenvolvimento do conhecimento científico.

Neste trabalho os autores se preocuparam, ao longo da dissertação, com temas relevantes e essenciais para a construção e validação da proposta de um Protocolo de Cirurgia Experimental em Ferida Cirúrgica em Ratos, são eles: Importância do Condicionamento dos Animais; Argumentação a respeito de Quando e Por Que utilizar Animais em Pesquisas; Descrição dos Procedimentos Gerais para Cirurgias Experimentais; Técnica Anestésica e de Curativo; Cobertura da Ferida; Eutanásia; e Descarte dos Animais.

A existência de protocolos confiáveis cientificamente possibilitará que, em um futuro próximo, tenhamos propostas de intervenção mais eficazes e mais eficientes no tratamento das feridas cirúrgicas.

Trata-se de tema de alta relevância e de importância transversal para os profissionais da área da Saúde. O convite é para que possamos realizar a leitura deste trabalho com o intuito de provocar acadêmicos, profissionais e pesquisadores da área a darem continuidade a este estudo, de forma comparativa ou não.

A conclusão deste trabalho científico é motivo de orgulho, de respeito aos princípios éticos com animais, e de avanço

do conhecimento científico na respectiva área de estudo.

Boa leitura!

Roberto Mattar Cepeda
*Presidente do Conselho Federal de
Fisioterapia e Terapia Ocupacional (COFFITO)*

1. Apresentação

A ferida em seu conceito é uma solução de continuidade da pele podendo ser aberta ou fechada e que normalmente tem sua origem traumática, há diversas classificações, quanto a sua origem. A área de pesquisa experimental com feridas vem crescendo dia a dia e nesta evolução um protocolo de procedimentos em feridas favorece em muito o campo para pesquisador onde favorece um delineamento ao experimento com animais. O desenvolvimento do protocolo deverá contemplar a necessidade do bem estar animal e a diminuição na utilização de números de animais em pesquisas permanecendo em consonância com a Ética, com os conceitos preconizados pelo Conselho Nacional de Controle Experimentação Animal. A utilização de animais para pesquisa em feridas tende a sofrer um declínio ao longo do tempo, desenvolvimentos de novos produtos e ou métodos alternativos esta em ascensão tecnológica e moralmente correta, com a realização de um protocolo este poderá contribuir para esta ascensão visto que novas técnicas de procedimentos para a retração da ferida ou produtos cujo sua ação promova a cicatrização em tempo menor ainda há de se utilizar espécie animal. Uma padronização nos procedimentos não significará uma estagnação em evolução nos estudos, isto porque surgirão técnicas melhores com o aprendizado adquirido pela utilização de um protocolo. A importância da diretriz fornecida por um protocolo nos pro-

cedimentos de feridas favorecerá e beneficiará o bem estar animal abreviando, contudo o sofrimento, uma intervenção rápida, segura, com conceito voltado ao bem da coletividade como um todo no aspecto animal como no humano gera ao protocolo uma ferramenta indispensável ao pesquisador.

A evolução da humanidade esta na capacidade do ser transformar o conhecimento em sabedoria, chegando a isto, através de um processo que teve origem a um protocolo certamente.

Wellington Delfino
Médico Veterinário

2. Introdução

Segundo o Dicionário Aurélio a palavra protocolo possui vários significados: “Ata, nota ou registro dos documentos governamentais, dos atos oficiais, da correspondência de um governo ou tribunal, de uma empresa, universidade etc. *Subdivisão de uma repartição pública (ou empresa privada) em que se registram e/ou se recebem os requerimentos, documentos ou processos. Recibo que registra o número e a data em que um processo ou requerimento foi catalogado e registrado. Acordo regulamentado entre países ou empresas: protocolo internacional. Figurado. Normas e procedimentos que se deve respeitar em cerimônias públicas; formalidade. Figurado. Reunião das regras que regulam os atos públicos; cerimonial. Antigo. Selo utilizado pelos romanos para registrar atos públicos. (Etm. do francês: protocole/ pelo latim: protocollum)” (FERREIRA, 1999).*

Para o presente projeto o protocolo pode ser definido como regras a serem seguidas para a prática da cirurgia experimental em Ratos para confecção de feridas cutâneas.

As pesquisas experimentais são importantes na medida em que estes auxiliam na compreensão dos fenômenos naturais. Na ciência médica permitem o melhor conhecimento da fisiologia, da etiopatogenia das doenças, da ação de medicamentos ou dos efeitos das intervenções cirúrgicas. Sua maior importância está relacionada ao respeito à barreira ética de não intervenção primária experimental em anima nobile. Nesse sentido, o modelo experimental deve ser, funcionalmente, o mais semelhante possível ao que se objetiva estudar. (FERREIRA,

HOCHMAN, BARBOSA,2005) Enfim a pesquisa experimental tem grande importância para o desenvolvimento de pesquisas para a ciência, sendo uma ferramenta fundamental para a descoberta de novos métodos e técnicas, sem expor em risco, ou minimizando os riscos aos seres humanos.

Apesar da crescente preocupação ética sobre a utilização de animais em pesquisa se faz necessário a padronização dos métodos e técnicas utilizados. E ainda que muito utilizadas existem poucos protocolos validados para as diversas técnicas de cirurgia experimental, se fazendo necessário a padronização das técnicas conhecidas para que os resultados das intervenções possam ser confrontados com menor viés e maior confiabilidade.

Vários pesquisadores relatam que ao realizamos um protocolo de pesquisa experimental é necessário que o profissional tenha compreensão das principais classificações dos modelos experimentais em pesquisa é fundamental para o aperfeiçoamento e comprovação de técnicas e procedimentos já existentes, assim como para o desenvolvimento de outros. E que esses animais reúnam condições ideais, e que sejam mantidos em ambiente controlado para que atendam os parâmetros de qualidade sanitária e genética, uma vez que são “reagentes biológicos”, e os resultados dos experimentos podem ser afetados em razão das condições de cada espécie utilizada. Ainda, quanto maior a uniformidade dos animais em relação às variáveis ambientais, genéticas e experimentais, menor será a quantidade amostral mínima de animais necessários para a pesquisa ser realizada. Assim, os animais utilizados em experimentação podem ser classificados quanto ao *status* ou condição sanitária, genotípica e como modelo experimental. (SCHANAIDER, 2004, SILVA; FERREIRA, HOCHMAN, BARBOSA,2005; SCHANAIDER, 2008; JR EDVALDO, HO, ALVES, ROCHA, 2012)

Devendo sempre ser observado os principais parâmetros exigidos pelos comitês internacionais e nacionais de ética e bem estar animal, higiene e biossegurança, acomodações e transporte, aclimatação, dieta e hidratação, bem como a técnica propriamente dita, iniciando pela preparação, anestesia, materiais e instrumentos utilizados e cuidados pós operatórios.

O manual de protocolo de cirurgia experimental representa um método eficiente e estruturado, enfim o método deve ser descrito passo a passo, claro e uniformizado. Possui uma estrutura simples capaz de levar a uma rápida e eficiente tomada de decisão pelo profissional na escolha do tipo de pesquisa, tipo de animal que será utilizado.

3. Importância do condicionamento dos animais

Margarida Maria de Carvalho Resende

O rato como qualquer outro animal precisa de ser tratado com respeito. De acordo com código de Ética animal da Sociedade Brasileira de Ciência em animais de Laboratório (SBCAL) é primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo e pela contribuição científica que ele proporciona (SBCALL, 2015).

Ainda, em relação à ética deve-se ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência (SBCAL).

Ratos de laboratório geralmente são curiosos, dóceis, se manipulados com frequências e gentilmente, tornam-se domesticados e treinados; são capazes de distinguir objetos que já viram antes, e tem também, a capacidade de sentir medo, dor, desconforto (ANDERSEN *et al*, 2004).

Para que o experimento seja realizado seguindo esses princípios, o rato como animal irracional precisa ser condicionado ao procedimento a ser realizado com finalidade de evitar estresse, seja fácil de manusear e evitar procedimentos bruscos.

Passos para o condicionamento

- Selecionar os ratos de acordo com os critérios do experimento.
- Segregar em gaiola individual, no mínimo 10 dias antes do experimento em prateleiras e em salas específicas para

essa segregação.

- Salas devem seguir normas de controle de ciclo claro e escuro de 12 horas, controle de temperatura, umidade e de ruídos e mantê-los com oferta de alimentação e hidratação à vontade.

- Mantê-lo nessa sala sem retirá-lo da gaiola, por 1 dia, para acostumar.

- No segundo e terceiro dia o pesquisador deverá pegar a gaiola com delicadeza, sem fazer ruídos em atritos com mesas ou bancadas, com movimentos suaves e colocá-la na sala de experimento.

Ficar perto da gaiola para que o rato sinta a presença do pesquisador, sinta o cheiro e perceba a voz, que deve ser em tom suave com direção de palavras rotineiras ao mesmo.

- No quarto e quinto dia repetir a mesma operação, e pegar o rato com luvas de couro, colocá-lo na bancada ou mesa do experimento e deixá-lo percorrer nesse novo território, explorando-o.

- Do sexto ao décimo dia pegar o rato com luvas de procedimento. A forma de pegar o rato é segurando-o pela pele do dorso, fazendo uma prega e estirando-a de forma a imobilizá-lo até que acostume. Soltar o rato na bancada ou mesa, cercado-o para que não possa escapar do local e deixá-lo sondar esse território. Deixá-lo se esconder em por debaixo do braço dobrado do pesquisador.

- Ao volta-lo para a gaiola manter movimentos suaves, sem jogar ou arrastar.

- Simular o procedimento do experimento para que se acostume.

- Ao final de 10 dias espera-se que o rato esteja condicionado, caso ainda esteja arisco, repetir procedimentos por mais dias.

Observa-se que o rato já esteja condicionado, pela sua docilidade e tranquilidade. Em caso contrário, quando observa-se agressividade, como tentar fugir, morder, urinar e defecar com frequência e aumento da frequência respiratória e cardíaca indicam sinais indicativos de falta de acondicionamento. Deve-se evitar no ambiente de condicionamento e manter no de experimento, falar alto, fazer excesso de ruídos, apertar, pegar no rato abruptamente, jogar o rato na gaiola.



Figuras de ratos em gaiola individual e em manuseio para condicionar manejos.

4. Quando e por que utilizar animais em pesquisas

A utilização de modelos animais em pesquisa não é algo novo, desde que Claude Bernard lançou seu trabalho “Introdução ao Estudo da medicina Experimental” no ano de 1865, no qual esse procurou estabelecer as regras e os princípios para o estudo experimental da medicina.

Mesmo com muitos debates e controversa, os modelos animais são largamente utilizados em pesquisas.

As justificativas para utilização do modelo animal são diversas como por exemplo não expor o ser humano ao risco, resguardando sua integridade física e emocional, dificuldades para se conseguir um número suficiente de indivíduos para a realização da pesquisa, conseguir um grupo homogêneo desses indivíduos para a realização de pesquisas, dificuldades de acompanhamento dos indivíduos durante o período da intervenção, agressividade da intervenção, abandono da pesquisa, coleta de material a ser pesquisado/analísado etc, esses são apenas algumas das dificuldades e limitações encontradas por pesquisadores que inviabilizam a pesquisa com seres humanos e justificam a utilização de modelos animais em pesquisas.

5.Procedimentos gerais para todas as pesquisas experimentais

5-1. Acomodações dos Ratos

Gaiolas de polipropileno com água e comida ad libitum, com no máximo 3 animais por gaiola.

É importante que o animal passe por um período de adaptação de no mínimo 10 dias, alocado individualmente na gaiola. Nesse período o animal deverá ser condicionado ao contato com o pesquisador e a permanecer no posicionamento a ser executado durante o processo.



Figura 2 - Sistema de alojamento das ratas, com numeração dos camundongos.

5-2. Condicionamento dos Ratos

Manejo dos animais dos Ratos

Retire o animal da caixa, suspendendo-o pela cauda e o coloque sobre a mesa ou bancada, sem soltá-lo;

Não deixe o animal suspenso no ar pois ele pode fazer movimentos bruscos que podem ocasionar o seccionamento da

cauda;

Mantenha o animal sobre a mesa segurando com cuidado na posição que esse foi condicionado.

Execute o procedimento desejado (injeção, coleta de fluidos) e libere o animal em seguida, devolvendo-o para a caixa.

6. Procedimento Cirúrgico

6-1. Técnica Anestésica

As ratas foram submetidas à anestesia por via intramuscular, com associação do anestésico Cloridrato de Quetamina (1mg/100g de peso) e do Cloridrato de Xilazina (2mg/100g de peso), para a produção de uma ferida circular em seu dorso (Figura 4). No pós-operatório imediato foram diluídas quatro gotas de Tylenol em 200ml de água.



Figura 3 - Anestesia das ratas.

6-2. Epilação dos Ratos

Com as ratas anestesiadas, deu-se início à epilação manual dos pelos. Primeiramente demarcou-se a região dorsal das ratas com pincel atômico, sendo quatro centímetros na largura e cinco centímetros no comprimento (figura 4) e os pelos foram retirados manualmente contra o sentido deles (Figura 4 e 5).



Figura 4 - Epilação manual dos pelos, fase inicial.



Figura 5 - Epilação manual dos pelos, fase final.

6-3. Demarcação com Punch

Para a demarcação da ferida foi utilizado um punch de aço inoxidável de 2,13cm de diâmetro, com um corte circular superficial (Figura 6). O punch foi pressionado contra a ferida e realizado um movimento circular, ora em sentido horário, ora em sentido anti-horário, realizando assim a demarcação da ferida (Figuras 7 e 8).



Figura 6 -
Punch de aço
inoxidável.



Figura 7 -
Aplicação do
Punch Metálico.



Figura 8 -
Área
demarcada.

6-4. Confecção da ferida cirúrgica

Após a demarcação da ferida com o punch, iniciou-se a remoção do tecido utilizando um bisturi com lâmina número 15 para a incisão e a ressecção da pele e do panículo carnoso até a fáscia muscular superficial, produzindo a ferida (Figuras 9, 10 e 11).

A remoção dos tecidos durava em torno de três a cinco minutos por animal, sendo que o mesmo estava anestesiado até

o fim do processo cirúrgico.

Após o ato cirúrgico, os animais foram encaminhados para avaliação e tratamento de acordo com o seu grupo e, posteriormente, alocados em uma mesa com O₂ ligado a quatro litros por minuto.

Ao término do efeito do anestésico as ratas foram encaminhadas para as respectivas gaiolas.

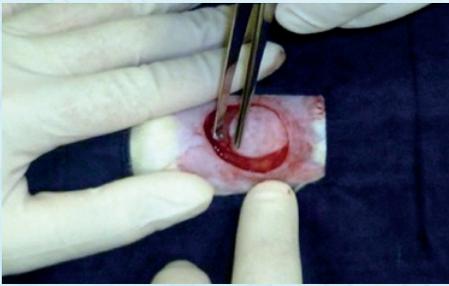


Figura 9 -
Confecção da ferida I.



Figura 10 -
Confecção da ferida II.



Figura 11 -
Ferida confeccionada.

7. Técnica de curativo em Ratos

A realização do curativo é procedimento que não deve ser desprezado pois o mesmo evita a infecção da ferida além de ser um momento em que o pesquisador acompanha a evolução do processo de cicatrização.

7.1- Higienização:

Para a higienização deve ser aquecido a 35°C 20 ml de soro fisiológico, despejado diretamente na superfície da ferida em um jato contínuo por meio de uma seringa de 20 ml (Figura 12).

Após a aplicação da solução fisiológica, a limpeza se deu por meio da utilização de uma gaze estéril, para secar a ferida (Figura 13).

Durante a limpeza, e sempre que necessário, foi realizado o desbridamento da crosta, com solução fisiológica e gaze estéril, sempre na fase inicial do processo da crosta.

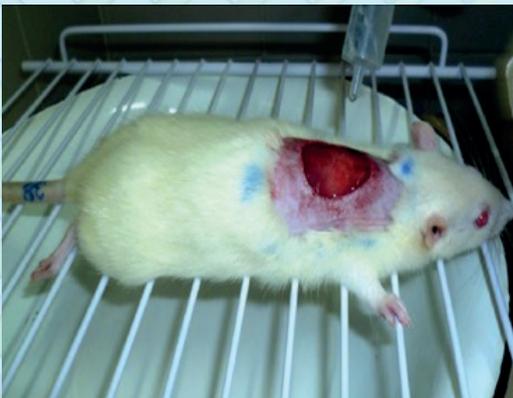


Figura 12 -
Solução
fisiológica
preaquecida.



Figura 13 -
Limpeza com
gaze não estéril.

7.2- Aplicação da cobertura na ferida

A cobertura da ferida é um processo importante a ser observado pelo pesquisador, tendo como objetivos: Proteção mecânica da área afetada; Reforço estrutural da superfície local; Contenção ou minimização de hemorragias; Absorção de exsudatos ou secreções oriundas do tecido afetado; Impedimento, minimização ou prevenção de infecções recorrentes.

7.2.1- Cobertura com Filme

O filme transparente é adesivo e estéril, complementado por suporte quadriculado para a mensuração da ferida. O filme é impermeável à água e bactérias e permeável aos vapores úmidos, permitindo que o excesso de exsudato evapore, minimizando a maceração da pele (Figuras 14 , 15 e 16).

O filme transparente é de dupla face e sua aplicação e remoção não causam dor ao animal, bem como não limitam o seu movimento, sendo indicado no tratamento de feridas superficiais, cortes, abrasões, pequenas queimaduras e áreas doadoras de enxerto.



Figura 14 - Cobertura com filme transparente.



Figura 15 - Filme transparente dupla face.



Figura 16 - Filme transparente dupla face sobre a ferida.

8. Eutanásia dos animais

Para a realização da Eutanásia serão seguidas as recomendações da RESOLUÇÃO NORMATIVA No - 13, DE 20 DE SETEMBRO DE 2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal CONCEA.

Para minimizar a dor e o desconforto devem ser utilizadas

drogas anestésicas, analgésicas, tranquilizantes e ainda a eutanásia.

A profundidade anestésica deve ser avaliada por meio da presença ou ausência de determinados sinais como reflexo da cauda, relexo palpebral e corneal e das alterações das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), que sofrem modificações de acordo com os planos atingidos (profundidade da anestesia).

Técnicas anestésicas sugeridas: Xilazina 5 a 10 mg/Kg + 50 a 75 mg/Kg Quetamina misturadas na mesma seringa.

Por definição, eutanásia é uma forma de abreviar-se a vida de um ser vivo, sem dor ou sofrimento. Os critérios primários para a eutanásia em termos de bem-estar animal são: Utilização de métodos sem dor; Os animais devem atingir rápido estado de inconsciência e morte; Requerer um mínimo de contenção, e evitar a excitabilidade do animal; Adequado para a idade e estado de saúde do animal em questão; Causar um mínimo de sofrimento e estresse; Simples de administrar (em pequenas doses, se possível); Seguro para o operador e tanto quanto possível, esteticamente aceitável para este; Deve ser realizada distante de outros animais.

Pentobarbital sódico: Injetado via intravenosa ou intraperitoneal age rapidamente e é uma forma aceitável de eutanásia. As pessoas envolvidas devem ser treinadas no método de injeção. Esta droga pode causar irritação do peritônio, o que pode ser evitado pela diluição. Para a realização da eutanásia é recomendada a utilização de três vezes a dose anestésica. Para a eutanásia de ratos e hamsters o pentobarbital pode ser administrado por via intraperitoneal, na dose de 100 mg/Kg e 23 80-150 mg/Kg, respectivamente, enquanto que para coelhos é utilizado na dose de 200 mg/Kg, por via intravenosa.

9. Descarte dos animais

Em biossegurança, o descarte de carcaças é um ato que requer grande senso de responsabilidade por parte do profissional que o está executando. Isso porque toda e qualquer carcaça, esteja ela contaminada por agentes patogênicos ou não, é considerada resíduo sólido, classificado como Grupo A, de acordo com a legislação em vigor em nosso país, expressa através da Resolução no 5, de agosto de 1993, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (aurtoe).

Mais especificamente, as carcaças de animais, mortos por morte natural ou sacrificados, devem ser destruídas o mais rápido possível, após a devida necropsia e colheita de material indicada, evitando-se assim o risco de contaminação do ambiente, por meio dos fluidos e das secreções excretados pelos cadáveres, que se transformam em excelentes meios de cultura. O armazenamento de carcaças requer cuidados especiais. É essencial o uso de sacos plásticos, com capacidade e resistência compatíveis com o peso das carcaças, devidamente identificados de acordo com a simbologia adotada internacionalmente (autor).

Depois de acondicionadas em sacos plásticos, as carcaças devem ser mantidas em câmaras frias, por no máximo 24 horas, ou em freezers a -18°C , caso não sejam levadas ao seu destino final. A proteção pessoal do profissional que manuseia carcaças de animais é fundamental. Uniformes adequados, com luvas e máscara, são recomendáveis. A consciência de que existe risco potencial de contaminação deve estar sempre presente na conduta dos técnicos. O transporte das carcaças deve ser em sacos plásticos ou caixas hermeticamente fechadas, de forma rápida e segura, evitando-se a contaminação do ambiente através de possíveis vazamentos de sangue ou outros excrementos do ca-

dáver do animal. Quanto ao destino das carcaças, este pode ser de três formas: aterro sanitário, autoclavação e incineração.

10- Bibliografia

Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins JCF, Magalhães LE, Tufik S. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. Gráfica Ave Maria. São Paulo. 2004.

BERNARD C, An Introduction to the study of experimental medicine (1865). In: Images from the history of medicine division. National Library of Medicine. Disponível em <http://www.nlm.nih.gov>

Schanaider A, SILVA PC. Uso de animais em cirurgia experimental. Acta Cir. Bras. 2004; 19(4):441-447.

Schneider TB. Ética e pesquisa. Acta Cir. Bras. 2008; 23(1): 107-111.

Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. Acta Cir. Bras. 2005; 20(2): 28-34.

FERREIRA, Aurélio Buarque de Holanda. Aurélio século XXI. 3.ed. RIO DE JANEIRO: Nova Fronteira, 1999. 2128p

Jr Edvaldo LR, Ho W, Alves M, Rocha EM. Progress in animal experimentation ethics: a case study from a Brazilian medical school and from the international medical literature. Acta Cir. Bras. 2012; 27(9):659-663.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL RESOLUÇÃO NORMATIVA No - 13, DE 20 DE SETEMBRO DE 2013, Disponível em http://www.mct.gov.br/upd_blob/0228/228451.pdf.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Resíduos Sólidos; Nbr 10004. Rio de Janeiro: ABNT, 1987.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução no 5. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, Diário Oficial da União, 1993.

MONREAL, J. & ZEPEDA, F. Consideraciones sobre el Manejo de Residuos de Hospitales en America Latina. Washington, D.C.: Opas, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Urban Solid Waste Management. Copenhagen: WHO, 1991-1993.

SBCALL. Princípios éticos na experimentação animal. Disponível em: http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65. Acesso em: 20 ago 2015.

