

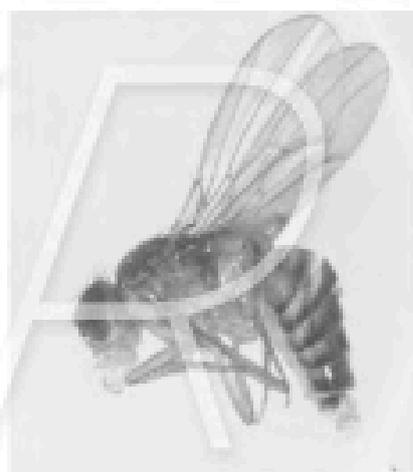
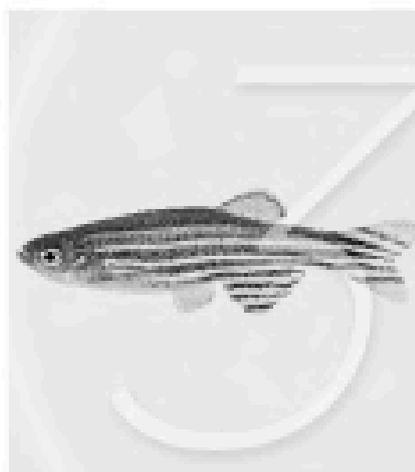
BIOÉTICA E MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Eduardo Carvalho Lira
(Organizador)



BIOÉTICA E MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Eduardo Carvalho Lira
(Organizador)



Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Bruno Oliveira

Camila Alves de Cremonesi

2022 by Atena Editora

Luiza Alves Batista

Copyright © Atena Editora

Natália Sandrini de Azevedo

Copyright do texto © 2022 Os autores

Imagens da capa

Copyright da edição © 2022 Atena Editora

iStock

Direitos para esta edição cedidos à Atena

Edição de arte

Editora pelos autores.

Luiza Alves Batista

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Biológicas e da Saúde**

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto

Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí

Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco



Bioética e manejo de animais de laboratório

Diagramação: Camila Alves de Cremona
Correção: Mariane Aparecida Freitas
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizador: Eduardo Carvalho Lira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B615 Bioética e manejo de animais de laboratório /
Organizador Eduardo Carvalho Lira. – Ponta Grossa
- PR: Atena, 2022.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-258-0130-8

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.308221909>

1. Animais de laboratório. 2. Bioética. I. Lira,
Eduardo Carvalho (Organizador). II. Título.

CDD 636.0885

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br



Atena
Editora
Ano 2022

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.



DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.



Nossos agradecimentos ao Prof. Msc. Joel Majerowicz pela gentileza em dedicar parte do seu tempo a realizar a correção técnica do manuscrito desta obra.

PREFÁCIO

Este livro nasceu do anseio de expandir conceitos sobre a ciência de animais de laboratório para os que iniciam suas carreiras acadêmico-científicas, promovendo o respeito e o bem-estar para com animais utilizados na experimentação científica. Essa semente sobre a importância do Bioterismo, lançada pela Professora Dr.^a Adela Rosenkranz através da formação de recursos humanos na América Latina reverberou no Nordeste do Brasil. Portanto, este livro é uma sinopse dos cursos de formação de alunos de pós-graduação e graduação, ao longo dos últimos dez anos, sobre Bioética e manejo de animais de laboratório que é ministrado pelo Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Iniciamos com um breve histórico sobre a utilização de animais para fins experimentais/didáticos, desde os primórdios da ciência, o que é amplamente questionado e discutido por correntes filosóficas antagônicas, que se posicionam na negativa absoluta baseada na suposição de maus tratos, ou aquelas favoráveis a utilização de animais como meio para o desenvolvimento tecnológico. Este preâmbulo é uma forma de aguçar a curiosidade do leitor e conduzi-lo aos capítulos seguintes nos quais são abordados a legislação brasileira para o uso de animais, os conceitos de biossegurança na experimentação animal, as principais espécies utilizadas na pesquisa experimental, os aspectos da fisiologia de ratos e camundongos e os métodos de colheita das amostras biológicas. Neste sentido, esta obra busca contribuir com o debate qualificado e focado no uso legal, ético como meio para encontrar soluções para diferentes problemas de saúde que afetam os animais, inclusive os humanos. Portanto, este livro é um preparo para aqueles que buscam a carreira científica, nas áreas das ciências biomédicas, mas também para aqueles que desejam ser informados dos conceitos atuais do bem-estar animal.

Glória Isolina Boente Pinto Duarte

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NA PESQUISA CIENTÍFICA – BREVE HISTÓRICO Glória Isolina Boente Pinto Duarte  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219091	
CAPÍTULO 2	5
BIOÉTICA: REGULAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM PESQUISA José Jairo Teixeira da Silva  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219092	
CAPÍTULO 3	12
PRINCIPAIS ESPÉCIES ANIMAIS UTILIZADAS EM PESQUISA EXPERIMENTAL Glória Isolina Boente Pinto Duarte  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219093	
CAPÍTULO 4	19
ASPECTOS GERAIS DA FISIOLOGIA DO RATO E CAMUNDONGO DE BIOTÉRIO Eduardo Carvalho Lira  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219094	
CAPÍTULO 5	27
ASPECTOS REPRODUTIVOS GERAIS DE RATOS E CAMUNDONGOS Dayane Aparecida Gomes Ismaela Maria Ferreira de Melo  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219095	
CAPÍTULO 6	34
ANESTESIA, ANALGESIA E EUTANÁSIA DE ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO Ismaela Maria Ferreira de Melo  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219096	
CAPÍTULO 7	49
BIOSSEGURANÇA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL Leucio Duarte Vieira  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219097	
CAPÍTULO 8	60
MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS MAIS UTILIZADAS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL Valéria Nunes de Souza  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219098	
CAPÍTULO 9	72
MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE MAMÍFEROS EM PESQUISA EXPERIMENTAL Samara Rodrigues Bonfim Damasceno Oliveira  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219099	
SOBRE OS ORGANIZADORES	88

CAPÍTULO 1

UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NA PESQUISA CIENTÍFICA – BREVE HISTÓRICO

Data de aceite: 01/03/2022

Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Profa. Dra. Universidade Federal de Pernambuco

A história da ciência mostra que se buscou nos animais a chave para compreensão das doenças, bem como estratégias terapêuticas para tratá-las. Desta forma, a pesquisa pré-clínica, ao longo dos anos, se tornou uma etapa fundamental para garantir que os medicamentos ou protocolos de tratamentos fossem seguros e eficazes. A experimentação animal fundamentou o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, particularmente, no que concerne às ciências biológicas e da saúde.

É importante assinalar que qualquer prática que utiliza animais para fins de pesquisa e/ou para fins didáticos é considerada experimentação animal.

A dissecação de animais com finalidade didática ou científica é praticada desde antes da era cristã. Segundo relatos históricos, o anatomista Alcmaeon (500 a.C.) foi quem realizou a primeira dissecação de cadáver humano. Outros anatomistas como Herophilus (330-250 a.C.) e Erasistratus (305-240 a.C.) realizaram vivisseções (intervenções em animais vivos, anestesiados ou não) para observar estruturas anatômicas e estabelecer hipóteses sobre seus funcionamentos, estabelecendo a comparação entre os órgãos de animais e os humanos.

Para Aristóteles (384-322 a.C.), um dos fundadores da filosofia ocidental, a superioridade de humanos em relação aos animais estabelecia uma hierarquia natural, na qual os seres com menor capacidade de raciocínio deveriam beneficiar aqueles considerados mais racionais. À época, o sistema filosófico pregava que o homem era o centro de todas

as coisas (antropocentrismo), portanto, tudo que havia na Terra era para servi-lo. Não havia questionamentos morais sobre as vivisseções, mesmo quando praticadas sobre homens condenados (gladiadores). Hipócrates de Cós (450-370 a.C.), considerado o pai da medicina ocidental, relacionava o aspecto dos órgãos humanos doentes aos órgãos de animais, alegando propósitos didáticos. Entretanto, a vivisseção com objetivos experimentais foi atribuída a Cláudio Galeno (129-210 d.C.), o que lhe deu o título de “pai da vivisseção”.

Galeno defendia a realização de procedimentos dolorosos em porcos, em substituição aos macacos, em razão da semelhança com humanos. Paradoxalmente, usou seres humanos para testar suas teorias de que o cérebro imprimia as sensações e o cerebelo comandava a musculatura. Na visão dele, a Anatomia era a base para medicina e, sem dúvida, seus conhecimentos publicados no livro *On Anatomical Procedures* foram fundamentais para essa ciência. Para Galeno, a vivisseção e a dissecação eram de extrema importância para a formação médica. Baseado em seus experimentos, surgiram teorias sobre as veias, artérias e coração que predominaram na medicina até o aparecimento das teorias revolucionárias de William Harvey em 1628.

O uso de animais para desvendar os segredos da vida e à ausência de conceitos éticos, colocou René Descartes (1596-1650 d.C.), no século XVII, como protagonista da teoria mecanicista, a qual preconizava a diferença entre seres autômatos e seres autônomos, na qual esses últimos apresentariam uma organização mais complexa. O discurso de Descartes baseava-se na separação do corpo e espírito. Assim, considerava que os homens se diferenciavam de animais a partir da capacidade para fazer uso da linguagem e do conhecimento (teoria mecanicista). Segundo essa teoria, os animais eram desprovidos de alma e, logo,

sem capacidade de sentir dor. Ao ser negada a condição de seres conscientes foi criado o conceito de seres autômatos ou máquinas naturais. Para Descartes, os animais eram autômatos, projetados por um Deus infinito e, portanto, máquinas mais engenhosas do que àquelas criadas pelo homem. Infelizmente, a teoria mecanicista contribuiu para a vivisseção e prática de experimentos cruéis. Ademais, Descartes acreditava que os animais eram gerados espontaneamente, tendo escrito "...Pois, como é necessária tão pouca coisa para fazer um animal, seguramente não é chocante que tantos animais, tantos vermes, tantos insetos se formem espontaneamente sob nossos olhos em toda matéria em putrefação" (DESCARTES, ATXI,506)

A teoria da geração espontânea foi compartilhada por vários estudiosos da época, mas felizmente estudos como os de William Harvey (1578-1638 d.C.) sobre a fisiologia da circulação, nos quais foram comparadas mais de 80 espécies diferentes que serviram para a descrição, pela primeira vez, dos detalhes de como o sistema circulatório permitia a circulação do sangue impulsionado pelos movimentos de contração muscular do coração. Esses estudos estabeleceram as diferenças entre artérias e veias e foram publicados em 1628 no livro *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus* (Estudo anatômico do movimento do coração e do sangue nos animais). Essa publicação foi um grande marco na fisiologia, pois até então acreditava-se na concepção de Galeno de que as artérias conduziam ar.

Há registros que em 1700, na Espanha, o médico Ibn Zuhr apresentou a experimentação animal como um recurso para testar procedimentos cirúrgicos antes de aplicá-los em pacientes humanos. No mesmo período, Stephen Hales usou um cavalo para demonstrar a medição da pressão arterial. Antoine Lavoisier usou um calorímetro e um animal como cobaia para demonstrar que a respiração era um tipo de combustível.

O movimento efervescente da ciência aliado à falta de normas para o uso de animais na experimentação, muitas vezes em práticas extremamente dolorosas, levou Jeremy Bentham (1749-1832) - um defensor da igualdade de condições de todos seres sensíveis a publicar o livro *Introduction to the principles of morals and legislation* (1789), que fundamenta os princípios morais e a legislação que normatiza os procedimentos da experimentação animal. O livro de Bentham estimula a sociedade a refletir sobre o uso de animais através de provocações: "Talvez chegue o dia em que o restante da criação animal venha a adquirir os direitos dos quais jamais poderiam ter sido privados, a não ser pela mão da tirania...A questão não é eles pensam? Ou eles falam? A questão é: eles sofrem" (BENTHAM, 1789). Desta forma seus tratados filosóficos provocam a discussão sobre a veracidade da incapacidade de sofrimento dos animais, sob a argumentação que a capacidade de sofrer, e não a de raciocinar, deve ser considerada na forma de tratamento dos animais. As reflexões de Bentham instigaram o surgimento da primeira lei de proteção animal na França, a qual qualificou o envenenamento de animais como crime. Em 1824, a primeira associação de proteção aos animais foi fundada na Inglaterra como será abordado em capítulo específico deste livro.

A obra *A origem das espécies*, de Charles Darwin (1809-1882), publicada em 1859, definitivamente marcou o século XIX e se tornou a base para Biologia ao possibilitar a relação entre modelos animais e seres humanos. Foi possível, através dos estudos de Darwin, estabelecer o vínculo existente entre as diferentes espécies animais no processo evolutivo, ou seja, os seres vivos descendem de um ancestral comum e a evolução é resultante de um processo de seleção natural e sexual.

A continuação dos estudos observacionais de Darwin resultou em 1871 no livro *The descent of man, and selection in relation to sex*. Em 1872, na tentativa de responder aos questionamentos sobre a teoria da evolução, a natureza humana, sua origem e psicologia, publicou o livro *The expression of the emotions in man and animals*. Neste trabalho, ele manteve a teoria de que as expressões humanas involuntárias são inatas e não aprendidas, sendo encontradas em humanos e espécies inferiores.

Ao longo da história da ciência é possível observar que os estudos realizados por fisiologistas e médicos, progressivamente, conduziram a superação da teoria mecanicista de Descartes, que estabelecia uma barreira distante entre homens e outras espécies animais. Neste contexto, Claude Bernard (1813-1878), aluno de François Magendie, um dos pioneiros da fisiologia experimental, estabeleceu regras e princípios para o uso de animais, como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana. Bernard prestou grandes contribuições ao

conhecimento da fisiologia que ele considerava a base da medicina. Seus achados sobre as funções dos nervos cranianos, o papel da biliar na digestão de proteínas, a teoria de que o fígado tinha função glicogênica, foram contribuições grandiosas para a medicina contemporânea.

A contribuição de Bernard para medicina e, particularmente, para a fisiologia é inegável, ele formulou a teoria do meio interno, referindo-se ao fluido entre as células, chamado de líquido intersticial e definindo a manutenção do equilíbrio do meio interno, o que permitiu a definição do termo homeostasia por Walter B. Cannon (1871-1945) em 1929. No livro *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* (Introdução ao estudo da medicina experimental) publicado em 1865, Bernard fundamenta a medicina científica nos conhecimentos de fisiologia. Segundo sua visão, a ciência é estabelecida por comparação e só é possível conhecer o estado patológico, se o estado normal for conhecido. Desta forma, Bernard considerava que os estudiosos teriam direito de fazer experimentos animais e vivissecção:

[...]Seria estranho se reconhecêssemos o direito de usar os animais para serviços caseiros, para comida e proibir o seu uso para a instrução em uma das ciências mais úteis para a humanidade. Nenhuma hesitação é possível; a ciência da vida pode ser estabelecida somente através de experimentos, e nós podemos salvar seres vivos da morte somente após sacrificar outros. Experimentos devem ser realizados tanto no homem quanto nos animais. Penso que os médicos já fazem muitos experimentos perigosos no homem, antes de estudá-los cuidadosamente nos animais (BERNARD, 1865)

Finalmente a teoria da geração espontânea deixa de ser considerada pelas evidências mostradas por Louis Pasteur (1822-1895) entre os anos de 1860 e 1865. Ao infectar ovelhas para provar a teoria dos germes, Pasteur demonstrou que as infecções não surgem espontaneamente, fortalecendo os achados de Darwin. Suas descobertas através da experimentação permitiram a validação do método científico. Mas, somente quando Pasteur desenvolveu a vacina contra a raiva utilizando cães e coelhos, em 1885, que ficou claro para a humanidade a importância do uso de animais na pesquisa científica. Em 1888, foi fundado o Instituto Pasteur, um dos mais famosos centros de pesquisa da atualidade.

A grande contribuição da experimentação animal para os grandes avanços da ciência pode ser exemplificada no desenvolvimento do eletrocardiograma (1913) por Einthoven, no qual foram utilizados porcos; na demonstração de Banting e Best (1921), que induziram o diabetes em cães para provar que o diabetes poderia ser tratado com a insulina (purificada por James Collip), achados que só foram amplamente aceitos quando Mering e Minkowski (1889) extirparam o pâncreas de cães, induzindo sintomas semelhantes ao diabetes, além de outros exemplos que vieram a melhorar a qualidade da vida humana e dos animais.

Há relatos que durante a Segunda Guerra Mundial, experiências cruéis foram cometidas utilizando o ser humano em campos de concentração, como o de Dachau na Alemanha, o que desencadeou uma série de ações para preservação da vida humana, entre elas o Código de Nuremberg (1947) que determinou que a experimentação no homem deveria ter como premissa à pesquisa em animais. Esse código foi reafirmado pela Declaração de Helsinque, Finlândia, em 1964.

O período imediatamente após Segunda Guerra Mundial foi caracterizado pelo crescimento da pesquisa biomédica e pelo uso crescente de animais de laboratório. Nessa época, as associações, sociedades médicas e de fisiologistas se uniram para lutar contra os ataques dos movimentos anti-vivissecionistas (*American Association for Laboratory Animal Science, American Physiological Society, National Society for Medical Research*) e para melhorar as condições de utilização de animais em laboratórios. Para isto, foi realizado um investimento na formação dos técnicos, preparando-os para manipular os animais.

Em 1990, no Brasil, foi criado o Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), responsável pela reforma sanitária que erradicou a epidemia da peste bubônica utilizando a obtenção de soro a partir do sangue de cavalos inoculados. Entre os anos de 1950 e 1960, o Laboratório Jackson (Jackson Laboratory) se tornou um centro de criação de várias linhagens puras (camundongos consanguíneos) e animais mutantes que passaram a ser modelos de doenças humanas. O primeiro mamífero transgênico foi criado nos anos 1970 por Rudolf Jaenisch, através da integração do DNA do vírus SV40, no genoma dos ratos. Em 1996, a ovelha Dolly foi o primeiro mamífero clonado a partir de uma célula adulta.

É importante destacar que mesmo quando são utilizados métodos *in vitro* para responder aos questionamentos científicos, seus resultados precisam ser validados para melhor confiabilidade. Para isto, é necessário que as investigações das funções fisiológicas, fisiopatológicas e interações entre os vários órgãos sejam realizadas em organismos inteiros. Apesar das discussões éticas, incitadas pelo dilema entre dor/sofrimento e o uso de animais em benefício dos homens e dos próprios animais, apenas em 1985 surgiu os primeiros textos na Europa sobre a proteção do animal utilizado para fins experimentais, um tema efervescente graças ao qual foram criadas regras para atender ao bem-estar animal, como será visto no capítulo sobre legislação brasileira para o uso de animais em pesquisa.

É inegável que a experimentação animal foi fundamental para a produção de soros e vacinas, possibilitando desenvolver vacinas contra a poliomielite, a varíola, o sarampo, além de conhecer e tratar doenças como leucemia, AIDS/HIV, as doenças cardiovasculares, imunológicas, realizar testes diagnósticos para o câncer etc. Entre os anos de 2020 e 2021, seu auxílio tem sido fundamental nos testes, a fim de buscar estratégias terapêuticas que possam combater a pandemia do SARS-CoV-2, coronavírus, vírus responsável por dizimar milhares de vidas humanas.

REFERÊNCIAS

BARBARA, Jean-Gaël. Histoire contemporaine des modèles animaux en médecine. **L'animal, enjeu de la recherche**, v. 4, n. 1, p. 8-14, 2015.

BENTHAM, J. **Uma Introdução aos princípios da moral e da Legislação**, 1789. Coleção Os Pensadores. São Paulo: Abril Cultural, 1979, 322 p.

BERNARD, C. **Introduction à l'étude de la médecine expérimentale**. J. B. Baillière et Fils. Paris: Éditions Garnier-Flammarion, 1966, 318 p.

DARWIN C. **A origem das espécies**. São Paulo, Martin Claret, 2004, 525 p.

DARWIN C. **A expressão das emoções no homem e nos animais**. Tradução Leon de Souza Lobo Garcia. Companhia do Bolso, 2009, 344 p.

FELISBERTO, A. D.S.; PRESTES, M.E.B. O método experimental de Claude Bernard: uma breve introdução e apontamentos para sua utilização no ensino de biologia. **Anais**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências - ABRAPEC, 2011.

FRANCO, N. H. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. **Animals**, n. 3, p.238-273, 2013.

McMULLEN, E.T. Anatomy of a physiological discovery: William Harvey and the circulation of the blood. **J. R. Soc. Med.**, v. 88, n. 9, p. 491-498, 1995.

REBOLLO, R. A. A difusão da doutrina da circulação do sangue: a correspondência entre William Harvey e Caspar Hofmann em maio de 1636. **Hist. Cienc. Saúde**, Manguinhos, v. 9, n. 3, p. 479-513, 2002.

REGIS A R. P., CORNELLI, G. Experimentação animal: panorama histórico e perspectivas. **Rev. Bioét.**, v. 20, n. 2, p. 232-43, 2012.

ROSENFELD, L. Insulin: discovery and controversy. **Clin Chem**, v. 48, n. 12, p. 2270-88, 2002.

Link: http://pt.wikipedia.org/wiki/Cláudio_Galeno. Acesso em: 14.01.2022

CAPÍTULO 2

BIOÉTICA: REGULAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Data de aceite: 01/03/2022

José Jairo Teixeira da Silva

Prof. Dr. Universidade Federal de Pernambuco

INTRODUÇÃO

A utilização de animais para fins científicos configura importante campo de discussão na Bioética, em especial, no que se refere ao bem-estar animal e aos direitos deles como ferramenta de estudo no ensino e nas pesquisas científicas. Compreende-se como experimentação animal a prática de realizar intervenções em animais não humanos vivos ou eutanasiados com o desígnio de beneficiar o conhecimento científico. Para tal finalidade, se faz necessário a constante atualização, formulação e implementação de políticas públicas relacionadas ao uso de animais na pesquisa científica.

É fundamental entender que as pesquisas biomédicas com animais constituem uma etapa importante na compreensão de diversos processos fisiopatológicos, bem como servem de base para

formulação de novos métodos de diagnóstico e de tratamento para diversas condições clínicas. A temática da utilização de animais para fins científicos está associada a uma ampla discussão entre a comunidade acadêmica, a sociedade em geral e os movimentos de defesa do bem-estar e dos direitos dos animais, sobre a escolha do método e do objeto de estudo e, portanto, a necessidade de intensificar a busca por alternativas metodológicas, quanto ao uso de animais em experimentos científicos.

EVOLUÇÃO HISTÓRIA DA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS

No que se refere à evolução histórica dos direitos dos animais não humanos no mundo, a utilização destes como ferramenta de investigação possui relatos desde a Antiguidade e, até os dias atuais, constitui interesse de discussão no campo da ética. Conforme demonstrado na tabela 1, as práticas de utilização de animais não humanos sofreram influências ao longo do tempo de diversas variáveis, como as características do período histórico e do contexto sociocultural.

Representante/Eventos – Descrição
Alcméon (500 a.C.) – Visissecções como método de comparação entre órgãos humanos e de animais.
Hipócrates (460 a.C.) – Pai da Medicina – Descrição dos primeiros relatos na história de visissecções com animais. Realizava comparativos entre órgãos de humanos doentes aos dos animais.
Aristóteles, (384-322 a.C.) – Defendia a superioridade dos humanos em relação aos animais, ou seja, uma hierarquia natural. Realizou estudos comparativos entre órgãos de humanos e de animais.
Herófilo (350-250 a.C.) e Erasístrato (350-240 a.C.) – Utilização da experimentação animal como ferramenta de investigação de sistemas orgânicos.
Galeno (130-200 d.C.) – Registro das primeiras visissecções com finalidade experimental.
Vesalius (1514-1564 d.C.) – Realizou práticas de visissecção em animais e comparou suas observações as características anatômicas de cadáveres. Sua prática contribuiu com a publicação do primeiro Atlas de Anatomia.
William Harvey e sua obra o “<i>Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus</i>” (1638) – Relatos da primeira visissecção sistemática do aparelho circulatório de aproximadamente 80 animais.
René Descartes (1596-1660) – O uso de animais para fins científicos, baseava-se no pressuposto pela “teoria mecanicista ou teoria do modelo animal”, a qual sustentava que os animais eram desprovidos de alma e, portanto, eram incapazes de sentir dor, diferenciando-os dos seres humanos.

Voltaire (1694-1778) – Acreditava que os animais era serem sencientes e, portanto, discordava da “Teoria Mecanicista”, proposta anteriormente por René Descartes.
Jeremy Bentham (1778) – Surge a base para os princípios morais e legislação atualmente utilizada nas regulações éticas dos procedimentos de experimentação animal. Representa um marco inicial em relação à proteção aos animais.
Lei Inglesa Anticrueldade (1822) – Constitui importante legislação contra maus tratos em animais, aplicável apenas para animais domésticos de grande porte.
Louis Pasteur (1822-1895) - Conhecido como o “pai da microbiologia”, através de experimentos com ovelhas, comprovou a “Teoria dos Germes”, na qual designava que as infecções não surgiam de modo espontâneo.
Criação da Sociedad for the prevention of cruelty to animals (1824)
Charles Darwin “A origem das espécies” (1859) – Descrição de um vínculo evolutivo entre as espécies animais, possibilitando a extrapolação dos dados obtidos em pesquisas com modelos animais para seres humanos.
Claude Bernard em sua obra “An introduction to the Study of Experimental Medicine (1865) – defendia e impulsionou o uso de pesquisas científicas com animais, o que revolucionou os campos de estuda da fisiologia e farmacologia.
British Cruelty to Animal Act (1876) – Surge a primeira lei a regulamentar o uso de animais em pesquisa no Reino Unido.
James Rowland Angell, The Ethics of Animal Experimentation (1909) – Primeira publicação sobre bem-estar animal no mundo.
Decreto nº 24.645/1934 – Surge no Brasil, a Lei Anticrueldade, considerada uma das primeiras medidas de proteção animal.
Russel and Burch, The Principles of Humane Experimental Technique (1959) – Define o Princípio dos 3Rs, – “replacement, refinement, reduction”, ou seja, substituição, refinamento e redução no uso de animais em pesquisa, respectivamente
Peter Singer, Animal Liberation: A New Ethics for Our Treatment of Animals, (1975) – Sugere que o sofrimento de cada espécie seja analisado e comparado ao sentido por membro de outra espécie, apesar de confessar que essa comparação não é completamente exata.
Publicação da Declaração Universal dos Direitos dos Animais, pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura – UNESCO (1978) – Esse evento trata-se de um marco histórico dos direitos dos animais não-humanos no contexto mundial. No que se refere a utilização de animais para fins experimentais, essa publicação no seu oitavo artigo, descreve: <p style="padding-left: 40px;">“A experimentação animal que implique sofrimento físico ou psicológico é incompatível com os direitos do animal, quer se trate de uma experiência médica, científica, comercial ou qualquer que seja a forma de experimentação. As técnicas de substituição devem de ser utilizadas e desenvolvidas”.</p> <p>Seus dispositivos serviram de base para legislações de diversos países, inclusive àquelas vigentes no Brasil.</p>
Lei nº 6.638 (1979) – No Brasil, surge a primeira legislação relacionada à experimentação animal, a qual estabelece normas para as práticas didáticas e científicas de vivisseções de animais em todo o território nacional.
Tom Regan - The Case for Animal Rights (1986) – Define critérios de discussão acerca dos direitos morais dos animais não humanos.
Lei nº 9.605, (1998) – Publicação da Lei dos Crimes Ambientais, no Brasil, dispõe dentre outros de sanções penais e administrativas no que se refere aos maus tratos em animais.
Lei Federal nº 11.794 – “Lei Arouca”, sancionada em outubro de (2008), no Brasil. Decreto nº 6.899, (2009) – o qual dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) no Brasil.
Criação no Brasil da Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais (Renama) (2012).
Criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), (2012).

Tabela 1. Síntese cronológica dos principais eventos relacionados às práticas vivisseccionistas mundo

Fonte: Elaborada pelo autor.

Conforme demonstrado na tabela 1, diversos eventos contribuíram para a criação e fortalecimento da legislação vigente no Brasil e no mundo, bem como ampliaram a discussão acerca da necessidade de expansão de métodos alternativos ao uso animal na experimentação e das práticas relacionadas ao bem-estar animal. Dentre estes marcos históricos, destaca-se o “Princípio dos 3R’s”.

A temática envolvendo os 3R’s originalmente foi proposta por Charles Hume, na década de 1950, fundador da Universities Federation for Animal Welfare, trata-se de uma entidade renomada que objetiva disseminação do conhecimento e compreensão das necessidades animais em diversos cenários, inclusive no que se refere aos animais de laboratório. Esse projeto teve célebres contribuidores como Peter Medawar, coordenador e Prêmio Nobel de imunologia e secretário da Sociedade de Defesa de Pesquisa da Grã-Bretanha, bem como teve

importante participação da fundadora, William Lane-Petter, do Animal Welfare Institute, nos Estados Unidos, o qual contribuiu significativamente com recursos destinados à publicação no ano de 1959 do livro “The Principles of Humane Experimental Technique” de autoria do zoólogo W. M. S. Russell e do microbiologista R. L. Burch.

Esses autores apresentam e elaboram o que se entende atualmente pelo princípio dos 3Rs, – *replacement, refinement, reduction* –, ou seja, substituição, refinamento e redução no uso de animais em pesquisa. Atualmente, esses princípios estão inseridos em diversas legislações no mundo, as quais regem o uso de animais de laboratório. Trata-se da orientação mais difundida e, portanto, amplamente aceita sobre como minimizar os impactos da utilização de animais para fins didáticos e/ou científicos. Esses princípios norteiam e estabelecem o uso de animais apenas quando eles não podem ser substituídos por alternativas não animais, quando o número de animais for reduzido ao máximo possível sem interferir na qualidade dos dados obtidos e, por fim, quando existir refinamento de todos os procedimentos e as condições relacionadas ao bem-estar animal (Tabela 2).

Princípio	Definição
Replacement (<i>Substituição</i>)	Trata-se de métodos que substituem ou evitam o uso de animais em pesquisas científicas. Ex. Utilização de cultura de células, modelos computacionais etc.
Reduction (<i>Redução</i>)	Refere-se ao fundamento que minimiza o uso de animais utilizados por experimento. Ex. Uso da estatística para determinar o menor número de animais que poderiam ser utilizados com eficácia durante o ensaio experimental etc.
Refinement (<i>Refinamento</i>)	Ferramenta que visa minimizar o sofrimento animal e objetiva melhorias relacionadas ao bem-estar animal. Ex. Uso de analgésicos, controle do macro e microambiente onde o animal está acondicionado, humanização dos procedimentos etc.

Tabela 2 – Princípios dos 3R's

Fonte: Elaborado pelo autor.

É importante salientar que, mesmo configurando um princípio descrito na década de 1950, o princípio dos 3R's, ainda hoje, representa um marco revolucionário e norteador das legislações que regem a utilização de animais para fins didáticos e/ou científicos em diversos países, inclusive no Brasil.

REGULAÇÃO DO USO DE ANIMAIS NO BRASIL

A legislação relacionada ao uso de animais em pesquisa científica no Brasil constitui algo recente. A primeira medida de proteção animal descrita no Brasil foi o Decreto nº 24.645/1934, que determinava a tutela pelo Estado, de todos os animais existentes no país. Subsequente, na década de 1970, surge a primeira legislação brasileira direcionada à experimentação animal, a Lei nº 6.638/1979, a qual estabelece normas para as práticas didáticas e científicas de vivisseções de animais em todo o território nacional. Apesar da publicação da lei, ela não foi devidamente normatizada, por exemplo, não houve especificação quanto ao órgão competente, aquele responsável por registrar, autorizar e fiscalizar os biotérios e os centros de experiências e demonstrações. É importante destacar que mesmo frente as suas fragilidades, é considerada um evento significativo na evolução da legislação brasileira relacionada à utilização de animais, pois abordou temáticas, quanto à vivisseção, à anestesia, à necessidade de supervisão de técnico especializado, às condições dos ambientes de criação e à manutenção, às penalidades, dentre outros.

Outro marco legislativo importante na bioética relacionada a experimentação animal, foi a publicação da Lei nº 9.605/1998, conhecida como a Lei dos Crimes Ambientais, que dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, em especial, ao que se refere

aos maus tratos em animais. Determina no artigo 32, pena de três meses a um ano para quem “praticar atos de abuso, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos, nativos ou exóticos (BRASIL, 1988, p.1)”. Ademais, no § 1º, art. 32, “incorre nas mesmas penas quem realiza experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem métodos alternativos (BRASIL, 1988, p.1)”.

A ausência de regulamentação e normatização da utilização de animais para fins didáticos e científicos no Brasil, bem como a necessidade de um diálogo efetivo entre os cientistas, sociedade em geral e os ambientalistas, resultou no Projeto de Lei (PL) nº 1.153/95, de autoria do deputado Sérgio Arouca. A tramitação na Câmara dos Deputados e no Senado Federal desse PL aconteceu durante 13 anos, e foi posteriormente sancionada como lei pelo Presidente da República, Luiz Inácio Lula da Silva, constituindo a Lei Arouca.

Sancionada em outubro de 2008, a Lei Federal nº 11.794, a “Lei Arouca”, regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal do Brasil, e estabelece procedimentos para o uso científico de animais, revogando a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979. Todas as etapas referentes à criação e ao uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica em todo o território nacional, obedecendo aos critérios elencados nesta lei. Disposta em seis capítulos, a lei estabelece um conjunto de diretrizes que regulamentam, dentre outras, a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAS), também define as condições de criação e o uso de animais para ensino e pesquisa científica, bem como as penalidades administrativas as instituições em caso de transgressão das disposições e do regulamento previsto nesta lei.

No que se refere ao CONCEA, trata-se de um órgão integrante do Ministério da Ciência e Tecnologia, configura-se uma instância colegiada e multidisciplinar, de caráter normativo, consultivo, deliberativo e recursal, composta por 14 membros, sendo eles, um representante de cada instituição: Ministério da Ciência e Tecnologia; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Ministério da Educação; Ministério do Meio Ambiente; Ministério da Saúde; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Conselho de Reitores das Universidades do Brasil (CRUB); Academia Brasileira de Ciências; Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência; Federação das Sociedades de Biologia Experimental; Colégio Brasileiro de Experimentação Animal; Federação Nacional da Indústria Farmacêutica; e dois representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

Conforme descrito na Lei nº 11.794/2008, artigo 5, compete ao CONCEA (BRASIL, 2008, p.1):

- I. Formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;
- II. Credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica;
- III. Monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa;
- IV. Estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;
- V. estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;
- VI. estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;
- VII. manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs), de que trata o art. 8º desta Lei;
- VIII. apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs;
- IX. elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;
- X. assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa tratadas nesta Lei.

Conforme descrito na Lei Arouca, artigo 8º, as CEUAS, constituem condição indispensável para o credenciamento de instituições com atividade de ensino e pesquisa com animais. Estas são constituídas por médicos veterinários, biólogos, docentes, pesquisadores na área específica e um representante de sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no Brasil.

As CEUAS deverão estar em consonância com as diretrizes propostas na Lei nº 11.794/2008, bem como nas resoluções do CONCEA. Compete a CEUA, examinar previamente todos os procedimentos de ensino e pesquisa institucionais que envolvam animais vertebrados não humanos; manter cadastro de todos os procedimentos realizados e dos pesquisadores da instituição a qual estiver vinculada; expedir certificação, no âmbito de suas atribuições, perante órgãos de financiamento a pesquisa e, por fim, notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de quaisquer acidentes com animais nas instituições credenciadas.

O capítulo IV da Lei Arouca dispõe das condições de criação e uso de animais para ensino e pesquisa científica, sendo competência do Ministério da Ciência e Tecnologia licenciar sobre as atividades destinadas à criação, ao ensino e à pesquisa científica de trata a referida Lei. Esta se dará mediante credenciamento ao CONCEA. É importante ressaltar que o animal só poderá ser submetido a quaisquer tipos de intervenção – antes, durante e após o experimento – mediante protocolos preestabelecidos pelo CONCEA e registro nas CEUAS institucionais. Objetivando o preconizado sobre bem-estar animal e o proposto pelo princípio dos 3Rs, a Lei Arouca, ainda no capítulo IV, estabelece recomendações quanto a eutanásia, utilização em atividades de ensino, número de animais utilizados, duração do experimento, tipo de experimento, manutenção, criação, sedação, analgesia e anestesia.

É importante destacar, conforme descrito na Lei nº 11.794/2008, artigo 17º, quanto as penalidades, todas as instituições que executem atividades envolvendo animais para fins de ensino e pesquisa científica serão reguladas por esta Lei e, em caso de transgressão, serão sujeitas as penalidades administrativas, as quais poderão ser desde uma advertência até a interdição definitiva.

Subsequente a publicação da Lei Arouca, foi publicado em 2009, o Decreto nº 6.899, o qual dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, além disso, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA). Destaca-se ainda, no Brasil em 2012, a criação da Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais (Renama) e do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM). Outro grande avanço na legislação brasileira quanto ao uso de animais para fins científicos, foi a publicação da Resolução – RDC nº 35/2015, do Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a qual dispõe sobre a aceitação e reconhecimento dos métodos alternativos de experimentação animal no Brasil pelo CONCEA.

CONCLUSÃO

Conforme evidenciado ao longo desse capítulo, o princípio dos 3Rs estabelecidos por Russel e Burch (1959) constituem a base da legislação no Brasil, e no mundo, quanto ao uso de animais para fins científicos e didáticos. Em conjunto, todas as legislações vigentes até essa data objetivam fortalecer os cuidados relacionados ao bem-estar animal e, busca reduzir, refinar e substituir a utilização destes por métodos alternativos, sempre que possível.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. Animal model is biological and biomedical research – experimental and ethical concerns. **Biomedical Sciences**, v. 91, 2019.

ANGELL, J. R. American Medical Association. **The ethics of animal experimentation**. Chicago: AMA; 1909.

BAEDER, F. M. *et al.* Percepção histórica da Bioética na pesquisa com animais: possibilidades. **Revista - Centro Universitário São Camilo**, v. 6, n. 3, p. 313-320, 2012.

BAEDER, F. M. *et al.* Percepção histórica da bioética na pesquisa com animais: possibilidades. **Bioethikos**, v. 6, n. 3, p. 313 – 320, 2012.

BONELLA, A. E. Animais em laboratórios e a lei Arouca. **SCIENTL studia**, v. 7, n. 3, p.507-514, 2009.

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**. Brasília, DF: Senado Federal, 1988.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Normativas do CONCEA**. 2016.

BRASIL. Decreto nº 24.645, de 10 de julho de 1934. **Estabelece medidas de proteção aos animais**. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1930-1939/decreto-24645-10-julho-1934-516837-publicacaooriginal-1-pe.html>. Acesso em: 20 set. 2021.

BRASIL. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. **Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm. Acesso em: 17 ago. 2021.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 9 Oct. 2008. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979. **Estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais e determina outras providências**. Disponível em: <https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=LEI&numero=6638&ano=1979&ato=656ETUU1EMrRVT53f>. Acesso em: 15 ago. 2021.

BRASIL. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. **Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm Acesso em: 10 ago. 2021.

CHAGAS, F. B; D'AGOSTINI, F. M. Considerações sobre a experimentação animal: conhecendo as implicações éticas do uso de animais em pesquisa. **Rev Red bioética**. v. 2, n. 6, p. 3546, 2012.

CLARK, J. M. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. **British Journal of Nutrition**, v. 120, 2018.

DALBEN, D; EMMEL, J. L. A Lei Arouca e os direitos dos animais utilizados em experimentos científicos. **Revista eletrônica de iniciação científica**. v. 4, n. 4, p. 280-291, 2013.

DE ÁVILA, R.I.; VALADARES, M.C. Brazil Moves Toward the Replacement of Animal Experimentation. **Alternatives do laboratory animal**, v. 47, n. 2, 2019.

FELIPE, S. T. Antropocentrismo, sencientíssimo e biocentrismo: perspectivas éticas abolicionistas, bem-estaristas e conservadoras e o estatuto de animais não-humanos, **Revistas Páginas de Filosofia**, v.1, n.1, 2009.

FRANCO, A. L.; NOGUEIRA, M. N. M.; SOUSA, N. G. K. pesquisas em animais: uma reflexão bioética. **Acta Bioethica**. v. 20, n. 2, p. 247-253, 2014.

FRIESE, C.; NUYTS, N; PARDO-GUERRA, J. Cultures of care? Animals and science in Britain. **The British Journal of Sociology**, v. 70, n. 5, 2019.

GUIMARÃES, M.V; FREIRE, J.E.C; MENEZES, L.M.B. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil, **Rev. Bioét.** v. 24, n. 2, p. 217-224, 2016.

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

MACHADO, C. J. S. *et al.* 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.

- MACHADO, C. J. S. *et al.* A regulação do uso de animais no Brasil do século e o processo de formação do atual regime aplicado à pesquisa biomédica. **História, ciências, saúde**. v. 17, n. 1, p. 87-105, 2010.
- MELLOR, D. J. Animal emotions, behavior and the promotion of positive welfare states. **N Z Vet J**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 2012.
- MENEZES H.S. Ética e pesquisa em animais, **Rev. Amrigs**. v. 46, n. 34, p. 105-108, 2002.
- MIZIARA, I. D.; MAGALHÃES, A. T. M; SANTOS, M. A.; *et al.* Ética da pesquisa em modelos animais. **Braz J Otorhinolaryngol**. v. 78, n. 2, p. 128-131, 2012.
- MIZIARA, I. D; *et al.* Research ethics in animal models. **Braz J Otorhinolaryngol**. v. 78, n. 2, p. 128 – 132, 2012.
- NACONECY, C. M. **Ética e Animais**: um guia de argumentação filosófica. Porto Alegre: EDIPUCRS: 2006.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA (UNESCO). **Publicação da Declaração Universal dos Direitos dos Animais**, 1978. Páginas Filos. v. 1, n.1, p. 01-30, 2009.
- PARODI, A. L. Ethical issue in animal experimentation. **Bull Acad Natl Med**. v.193, n.8, p.1737-1745, 2009.
- PIERDONÁ, N. *et al.* Aspectos éticos da pesquisa em animais. **Rev Med Saude Brasília**, v. 5, n. 1, p.170-715, 2016.
- PIMENTA, L. G.; SILVA, A. L. Ética e experimentação animal. **Acta Cirúrgica Bras.**, v. 16, n. 4, 2001.
- REGAN, T. **The case for animal rights**. London: Routledge. 1986.
- REGIS, A. H. P.; CORNELLI, G. Experimentação animal: panorama histórico e perspectivas. **Rev bioét**, v. 20, n. 2, p. 232-243, 2012.
- REZENDE, A. H. *et al.* Experimentação animal: ética e legislação brasileira. **Rev. Nutr.**, v. 21, n. 2, p. 237-242, 2008.
- REZNIKOV, A. G. Bioethical aspects of experiments on the animals. **Klin Khir Russian**, v. 6, n. 8-13, 2010.
- RODRIGUES, D.T. **O direito dos animais: uma abordagem ética, filosófica e normativa**. Curitiba: Juruá; 2005.
- ROMERO-FERNANDEZ, W. *et al.* The 1, 2, 3 of laboratory animal experimentation. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 33, n. 2, p. 288-299, 2016.
- RUSCHE, B. The 3Rs and animal welfare: conflict or the way forward? Alternatives to animal experimentation. **Bern**, v. 20, Sup. 1/3, p. 63-76, 2003.
- RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen; 1959.
- SCHUPPLI, C.A. *et al.* Expanding the three Rs to meet new challenges in humane animal experimentation. **ATLA journal**. v. 32, p. 525-532, 2004.
- SINGER, P. **Animal liberation: A new ethics for our treatment of animals**. 1975.
- SINGRT, P. **Animal liberation**. London: Jonathan Cape. 1975.
- STEFANELLI, L.C.I. Experimentação animal: considerações éticas, científicas e jurídicas. **Ciênc Biol Agrar Saúde**, v. 15, n. 1, p. 187-206, 2001.
- WATANABE, M.; *et al.* Aspectos instrumentais e éticos da pesquisa experimental com modelos animais. **Rev. Esc. Enferm. USP**. v. 48, n. 1, p. 181-188, 2014.
- ZURLO, J. *et al.* The Three Rs: The Way Forward. **Environmental Health Perspectives**. v. 104, n. 8, 1996.

CAPÍTULO 3

PRINCIPAIS ESPÉCIES ANIMAIS UTILIZADAS EM PESQUISA EXPERIMENTAL

Data de aceite: 01/03/2022

Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Profa. Dr^a Universidade Federal de Pernambuco

INTRODUÇÃO

Houve, no início do século XX, um grande avanço na experimentação animal e os roedores passaram a ocupar papel de destaque devido às suas semelhanças fisiológicas com os humanos. Ainda que a experimentação animal seja permeada por discussões e reflexões que suscitam questões religiosas, éticas e morais, não foi encontrada uma alternativa para reproduzir a complexidade do ser humano nem de outros mamíferos cujos órgãos possuem funções integradas e reguladas. Logo, em quase todas as descobertas médicas, ela continua a ter um papel essencial nas técnicas cirúrgicas modernas, como os transplantes renais, cardíaco etc., cabendo ao pesquisador a obrigatoriedade da implementação de procedimentos que tornem o modelo animal mais próximo ou adequado aos objetivos científicos propostos, para que sejam confiáveis e respeitem às exigências dos protocolos experimentais e o bem-estar animal (um conceito contemporâneo).

A reprodutibilidade dos resultados experimentais é um dos problemas mais importantes na investigação científica, o que leva à necessidade de se ter um modelo animal que responda à hipótese científica cujos resultados possam ser reproduzidos por outros pesquisadores. Nesse sentido, os roedores são mamíferos que têm várias semelhanças com os humanos, entre as quais os sistemas orgânicos, mecanismos de regulação e as áreas cerebrais,

além da similaridade genética. São animais de fácil manutenção, no caso de ratos e camundongos têm um período de gestação curto, prole numerosa e suportam técnicas de produção para obtenção de animais axênicos (*germ free*). Camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*) representam 90% dos animais utilizados na pesquisa científica, mesmo com a grande variedade de animais que é utilizada. Eles são utilizados para infecções experimentais (viral, bacteriana ou parasitológica) para reações imunológicas, oncológicas etc. Os ratos também são frequentemente utilizados nos estudos comportamentais endócrinos, nutricionais; enquanto, os camundongos são mais utilizados para estudar às doenças humanas de origem genética. Todavia, estes últimos são sensíveis às mudanças de condições ambientais e as pequenas flutuações de temperatura (2°C a 3°C), as quais podem alterar sua fisiologia.

Ambos, ratos e camundongos, podem ser classificados geneticamente como consanguíneos ou isogênicos (*inbred strain*) e heterogênicos ou não consanguíneos (*outbred strain*). Embora, na literatura é comum o termo linhagem, alguns autores recomendam que ele deve ser restrito aos animais isogênicos, os quais resultam do acasalamento sistemático e ininterrupto entre irmãos, por mais de 20 gerações, atingindo um coeficiente de consanguinidade de 98,6%.

As principais características das linhagens isogênicas são homozigose, uniformidade fenotípica e estabilidade genética em longo prazo. Enquanto, o termo colônia ou *stock* é utilizado para animais heterogênicos, sendo necessários acasalamento rotacional para manter a heterogeneidade. A colônia de ratos e camundongos deve ser mantida fechada por algumas gerações e o acasalamento deve ser monogâmico.

O rato mais comumente utilizado na investigação

científica foi originalmente desenvolvido no Wistar Institut¹ por Henry Donaldson, Milton Greenman e Helen Dean King, em 1906, por isso mesmo é denominado rato Wistar (Figura 1). Estes animais são heterogênicos e caracterizam-se por serem dóceis, de orelhas alongadas, cabeça grande e comprimento da cauda menor que o comprimento corporal, ademais têm boa capacidade de aprendizado e baixa incidência tumoral e de alopecia, porém, contraem facilmente doenças respiratórias, daí a importância do ambiente ser monitorado, principalmente, no que se refere aos níveis de amônia. Estes animais são amplamente utilizados em estudos que envolvem reumatologia, endocrinologia, envelhecimento, nutrição, oncologia, entre outros.



Figura 1 — Rato Wistar

Fonte: Próprio autor.

A partir da colônia Wistar foram desenvolvidas as colônias Sprague Dawley e Long-Evans. A colônia inicial dos ratos Sprague Dawley, heterogênic, foi desenvolvida em 1925 e adquirida pela companhia Charles River em 1950. Estes animais são amplamente utilizados para desenvolver modelos animais de diabetes, obesidade, câncer e doenças cardiovasculares. Eles também são utilizados nos testes de segurança e eficácia, envelhecimento, nutrição, cardiologia, obesidade induzida por dieta, oncologia e modelo cirúrgico de insuficiência cardíaca. Os ratos são os animais preferenciais nos estudos que envolvem o desenvolvimento de medicamentos devido à semelhança com humanos.

A colônia Long-Evans foi desenvolvida pelos Doutores Long e Evans, em 1915, para estudos de fisiologia reprodutiva. Essa colônia foi desenvolvida através de vários cruzamentos entre fêmeas albinas do Wistar Institute com machos selvagens cinza. Os ratos Long Evans são utilizados em estudos que envolvem obesidade induzida por dieta, nutrição, estudos neurológicos, toxicológicos, oftalmológicos e comportamentais. Esses ratos conhecidos como “rato com capuz” têm coloração branca com cabeça preta (Figura 2), às vezes branca com cabeça marrom. Possuem maior resistência a problemas respiratórios que outros ratos heterogênicos, logo é uma boa escolha para procedimentos cirúrgicos que utilizam anestésicos inalatórios por um período prolongado.

¹ <https://wistar.org/>.



Figura 2 — Rato Long-Evans

Fonte: Próprio autor.

Ainda que ratos e camundongos sejam os animais mais utilizados nas pesquisas biomédicas, uma das questões que se impõe é a relação entre a idade deles e a dos humanos. A literatura mostra que os ratos crescem rapidamente durante a infância e se tornam sexualmente maduros por volta da sexta semana, mas só atingem a maturidade social 5-6 meses depois. Porém, há divergências quanto à correlação com a idade adulta; alguns estudos sugerem que cada mês da idade do animal é aproximadamente três anos humanos. Essa correlação deve ser bastante cautelosa e considerar os dados que estão sendo analisados.

Desde o século XVII, o camundongo é utilizado na pesquisa científica, quando o Dr. Hooke utilizou este modelo animal para investigar doenças infecciosas. Em 2002, a revelação do genoma do camundongo mostrou que tem cerca de 24.000 genes, os quais são distribuídos em 40 cromossomos, enquanto os humanos possuem 46 cromossomos. A similaridade entre os genomas do camundongo e humano é de 70% a 90%.

O camundongo de laboratório é um híbrido cujo genoma é um mosaico de três subespécies, *Mus musculus domesticus*, *Mus musculus musculus* e *Mus musculus castaneus*. Logo, como o camundongo de laboratório foi criado para ter maior uniformidade genética, ele se tornou geneticamente muito diferente dos selvagens e são menos agressivos. Ademais, a obtenção de linhas consanguíneas permite obter resultados experimentais precisos e comparáveis.

Dentre os ratos isogênicos, destacamos o rato espontaneamente hipertenso (SHR), obtido originalmente do cruzamento de seu controle normotenso Wistar-Kyoto (WKY) com ratos Wistar *inbred*. Esta linhagem é utilizada como modelo para estudos de hipertensão essencial ou primária. A pressão arterial dessa linhagem apresenta valores normais até a quarta semana de idade, a partir daí aumenta drasticamente até a décima primeira semana, com incremento gradual até a vigésima semana de idade, quando atinge valores entre 180 e 200mmHg de pressão arterial sistólica. Nos estágios precoces da hipertensão, neste modelo, o débito cardíaco está aumentado e a resistência periférica total normal, mas com a evolução do quadro, o débito cardíaco retorna ao normal e à resistência periférica aumenta. No estágio final do quadro, desenvolvem mudanças na estrutura cardíaca (hipertrofia cardíaca) que culmina em insuficiência cardíaca.

Os ratos WKY, usados como ratos controles para os SHR, apresentam um aumento da pressão sistólica até a décima semana, quando estabiliza em 126 mm de Hg. Eles têm características comportamentais que podem servir como marcadores de depressão. Evidências experimentais mostraram que ficam imóveis por um tempo maior no teste de natação forçada (um teste usado como marcador para “desespero comportamental”). Ainda, apresentam atividade diminuída no teste de campo aberto (teste para exploração de novidades e ansiedade) e

anedonia aumentada (perda da capacidade de sentir prazer) em resposta ao estresse crônico e estresse agudo.

Os camundongos cruzados aleatoriamente não são definidos geneticamente, conseqüentemente, são colônias mais fáceis de criar e apresentam frequência de acasalamentos produtivos próxima a 100%. Uma das colônias *outbred* mais utilizadas é a Swiss (ou camundongo suíço). Os camundongos Swiss resultam de uma seleção de cruzamentos feita pelo Dr. Webster, usando uma colônia de camundongos oriunda da Suíça e mantidos no instituto Rockefeller, nos Estados Unidos, em 1926. São utilizados como modelos em estudos farmacológicos, tumores de mama, pulmão, doenças autoimunes etc. A colônia Swiss Webster é usada para vários propósitos, entre os quais está o teste de segurança para drogas. As fêmeas são usadas como receptoras de embriões e pseudogestantes para aleitamento de lactentes.



Figura 3 – Camundongos Balb/c e C57BL/6

Fonte: Próprio autor.

A linhagem C57BL/6 é classificada como *inbred*. Esta linhagem foi obtida por Little em 1921, na busca de produzir linhagens isogênicas. Sua uniformidade genética permite a redução do número de animais para a realização de experimentos. Por outro lado, pela alta consanguinidade, apresenta maior susceptibilidade às doenças e uma menor capacidade reprodutiva. Possui pelagem escura, variando do marrom escuro ao preto (Figura 3). É empregada para estudos do diabetes, de obesidade, além de estudos nas áreas da imunologia, neurobiologia, comportamento e oncologia. Essa linhagem tem a preferência aumentada por álcool e narcóticos, o que a torna adequada para estudos genéticos que objetivam avaliar a preferência por estas substâncias. Enquanto, a linhagem Balb/c (Figura 3) foi criada em 1923 por Bager e pelo almirante McDowel, sendo frequentemente utilizada para a produção de anticorpos monoclonais.

O desenvolvimento de modelos animais permite mimetizar várias características de uma doença. Alguns modelos são de interesse da pesquisa básica, outros, da terapêutica. Os modelos podem ser induzidos por uma perturbação metabólica, como é o caso da obesidade provocada pelo consumo de dietas hipercalóricas, ou por administração de um agente químico (diabetes induzido por aloxana ou por estreptozotocina) ou ainda, pela criação de cepas geneticamente modificadas para reproduzir doenças neurodegenerativas, por exemplo. Há um número considerável de modelos animais, como camundongos, ratos, hamsters, cobaias, coelhos, primatas e peixes. Os coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) (Figura 4) mais empregados na experimentação são das raças holandesa e neozelandesa.



Figura 4 - Coelho (*Oryctolagus cuniculus*).

Fonte: Próprio autor.

Eles pesam entre 4kg a 6 kg, e devem ser mantidos em gaiolas individuais, os machos devido à disputa de território e as fêmeas por poderem apresentar pseudogestação. A facilidade de acesso ao sistema circulatório, através das veias marginais de sua orelha, permite os estudos imunológicos e sorológicos. Esses animais são de grande valia nas investigações sobre a aterosclerose, os linfomas malignos, o choque, inflamação, hipertermia, fisiologia reprodutiva etc.

Os hamsters são utilizados nos estudos de reprodução, de citogenética e imunologia. Apesar de existirem mais de 54 espécies de hamsters, apenas três espécies de gêneros diferentes são as mais empregadas nas pesquisas biomédicas: *Mesocricetus auratus*, *Cricetulus griseus* e *Cricetulus cricetus*.

Os porquinhos da Índia ou cobaias (*Cavia porcellus*) frequentemente são empregados para testes de sensibilidade cutânea, estudos de anomalias congênitas, microcirculação, histocompatibilidade, doenças infecciosas, neoplasias do trato respiratório e pâncreas, distrofias musculares, miocardiopatias e cálculos biliares. Além de ser um modelo eficiente para estudar os efeitos hormonais, também permite a demonstração de carência por vitamina C.

Na busca de um animal vertebrado para uso em genética molecular, George Streisinger sugeriu no início dos anos 1980, o Zebrafish (*Danio rerio*) conhecido como peixe-zebra ou como paulistinha. Ele é originário do Paquistão, norte da Índia, Nepal e Bangladesh. Em 2013, foi publicada a sequência completa do seu genoma, observando-se que cerca de 70% de seus genes são similares aos humanos. É interessante que foi observado que mais de 80% dos genes conhecidos por desencadear doenças em humanos, estão presentes no peixe-zebra. Ele apresenta as vantagens de modelos invertebrados, como elevada taxa reprodutiva, tamanho pequeno (3-5 centímetros na idade adulta), facilidade de manejo, baixo custo de manutenção e possibilidade de emprego em diversas áreas da ciência, como farmacologia, toxicologia, imunologia, doenças infecciosas e manipulação genética. É um animal de interesse como modelo para estudos sobre doenças neurodegenerativas, comportamento etc. Um casal de peixe-zebra pode produzir 300 ovos por semana e as larvas eclodem dois dias após a fertilização. Seus embriões são quase transparentes, o que permite ao pesquisador examinar facilmente o desenvolvimento de estruturas internas, muitas vezes utilizando apenas um microscópio simples. Curiosamente, eles têm a capacidade única de reparar o músculo cardíaco, ou seja, se parte de seu coração for removido, ele pode ser recuperado em algumas semanas. Esta observação é promissora na área da cardiologia.

A pandemia da SARs-CoV-2 incitou a procura do modelo ideal para encontrar a estratégia terapêutica para combater essa infecção viral, uma vez que o modelo mais comum na pesquisa não é sensível ao vírus, isso

porque o receptor murino para ECA-2 (enzima de conversão da angiotensina-2) que permite a entrada do vírus nas células, difere em vários aspectos daquele encontrado em humanos. É possível que modelos transgênicos de camundongos, com receptores de ECA-2 humanos, possam vir a ser infectados pelo SARs-CoV-2. Nesse sentido, o hamster possui o receptor para ECA-2 mais parecido com o humano, sendo demonstrado que o hamster é suscetível ao SARs-CoV-1. Após a infecção com o SARs-CoV-2, as manifestações apresentadas por esse roedor são similares à infecção respiratória humana, ademais foi encontrado grande quantidade do vírus nos pulmões e intestinos. Logo, esse modelo pode ser empregado para o estudo dos mecanismos do vírus, sua transmissão e infecção.

O furão é um modelo importante para o estudo das doenças respiratórias, principalmente da gripe. Este modelo foi utilizado para estudar o ebola e a SARS, sendo observado que 93% dos animais mais velhos que contraem a SARS-CoV-2 morrem, enquanto os animais jovens desenvolvem sintomas mais leves da doença. Essa semelhança com o desenvolvimento da doença em humanos, o torna um modelo interessante, principalmente ao considerar que ele pode transmitir o vírus.

Os macacos (*cynomolgus e rhesus*) infectados pelo SARS-CoV-2 desenvolvem as lesões pulmonares com evolução clínica similar à humana. Nesse contexto, é importante assinalar que os primatas possuem um sistema imune e genético muito próximo ao humano. São utilizados para estudar a fisiopatologia do vírus, a influência das comorbidades e a avaliação de vacinas, bem como outras estratégias terapêuticas. Portanto, é inegável a contribuição dos vários modelos animais na busca por uma melhora na qualidade de vida dos humanos e não humanos, haja visto o progresso das ciências biomédicas. Apesar dos esforços e avanços da ciência para substituir a experimentação animal por métodos alternativos, ainda não é possível prescindir dos modelos animais.

REFERÊNCIAS

- ABLAIN, J.; ZON, L.I. Of fish and men: using zebrafish to fight human diseases. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 12, p. 584-586, 2013.
- BAMBINO, K., CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. **Curr Top Dev Biol**, n. 124, p. 331-367, 2017.
- BARRÉ-SINOUSSE, F., MONTAGUTELLI, X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. **Future Science AO**, v. 4, n. 1, 2015.
- BOCKAMP, E. et al. Of mice and models: Improved animal models for biomedical research; *Physiol.* **Genomics**, 11: 115-132, 2002
- BRAGA, L. M. G. M. Controle reprodutivo em biotérios de criação de animais de laboratório com ênfase em roedores. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 105-109, 2017.
- BROWER, M. et al. Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. **Lab Anim Res.**, v. 31, n. 4, p. 166-173, 2015.
- CASELLAS, J. Inbred mouse strains and genetic stability: a review. **Animal**, n. 5, p. 1-7, 2010.
- CHAN J.F. et al. Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease. **CID**, 71, 2019 <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
- GORSKA, P. Principles in laboratory animal research for experimental purposes. **Med Sci Monit.**, v. 6, n. 1, p: 171-180, 2000.
- GUÉNET, J. L. The mouse genome. **Genome Res.**, n. 15, p. 1729-1740, 2005.
- GUÉNET, J. L. et al. **Genetics of the Mouse**. Berlin: Springer, 408p, 2015.
- HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**. v. 496, n.7446, p. 498-503. 2013.

JOHNSON-DELANEY, C. **Small rodents**: rats. Florida: Exotic Companion Medicine Handbook, 200p, 1996.

OKAMOTO, K., AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circ. J.**, n. 27, p. 282-293, 1963.

RICHTER, C.P. The effects of domestication and selection on the behavior of the Norway rat. **J Natl Cancer Inst.**, n. 15, p. 727-738, 1954.

SAI, S.F. et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. **Nature**, v. 583, n. 7818, p. 834-838, 2020.

SENGUPTA, P. The laboratory rat: Relating it's age with human's. **Int J Prev Med.**, v. 4, n. 6, p. 624-630, 2013.

WEINTRAUB, A. All eyes on zebrafish. **Lab. Anim.** 46, 323–326, 2017.

WILL, C. C., AIRD, F., REDEI, E. E. Selectively bred Wistar-Kyoto rats: an animal model of depression and hyper-responsiveness to antidepressants. **Molecular Psychiatry**, n. 8, p. 925-932, 2003.

CAPÍTULO 4

ASPECTOS GERAIS DA FISIOLOGIA DO RATO E CAMUNDONGO DE BIOTÉRIO

Data de aceite: 01/03/2022

Eduardo Carvalho Lira

Prof. Dr. Universidade Federal de Pernambuco

INTRODUÇÃO

Os primeiros registros de experimentos utilizando animais em ciência datam do século V a.C. Nos séculos subsequentes, o uso dos animais em pesquisa contribuiu decisivamente para o progresso científico. Diferentes espécies animais são utilizadas na experimentação científica para reproduzir, em condições controladas, doenças que afetam humanos e outros animais. Roedores são, notoriamente, os mais utilizados nas pesquisas biomédicas em diferentes áreas, como a imunologia, farmacologia, toxicologia, fisiologia, neurociências, biologia do envelhecimento, entre outras.

O rato de laboratório (*Rattus norvegicus*) pertence ao gênero *Rattus* que reúne mais de 136 espécies, assim agrupadas: (a) *norvegicus* ou rato marrom; (b) *exulans* ou rato do pacífico; (c) *rattus* ou rato preto e espécies relacionadas; (d) *fuscipes* ou espécies nativas da Austrália; (e) *leucopus* espécies nativas da Nova Guiné; (f) *xanthurus*, e (g) animais com diferenças filogenéticas importantes e ainda não bem definidas.

Embora existam diferentes espécies, apenas três delas colonizaram ambientes urbanos globalmente: o rato norueguês ou rato marrom (*R. norvegicus*), o rato preto ou de telhado (*R. rattus*) e o rato preto asiático (*R. tanezum*), os quais habitam praticamente todos os territórios no planeta, exceto Antártida, Nova Zelândia e a província canadense de Alberta. A espécie *R. exulans* ocorre somente em áreas tropicais da Ásia e do Pacífico.

O *R. norvegicus* apesar de seu nome popular rato da Noruega, sua provável origem é o norte da China, onde foram encontrados fósseis do Período Holoceno e final do Pleistoceno. Também se sugere a origem do *R. norvegicus* na Sibéria. Independentemente de sua origem, a disseminação desses animais pela Europa e Estados Unidos da América (EUA) ocorreu no século XVIII, sobretudo, com o desenvolvimento do comércio. Em meados do século XIX, eles já eram amplamente utilizados nos estudos experimentais de anatomia, farmacologia, fisiologia e nutrição.

O rato (*Rattus norvegicus*) como modelo biológico para produção do conhecimento científico

O primeiro registro de estudos experimentais utilizando o *Rattus norvegicus* foi uma adrenalectomia realizada pelo Dr. J. M. Philipeaux em 1856. Rapidamente, estes animais se tornaram a principal escolha para o estudo de fisiologistas, farmacologistas e demais profissionais das áreas biomédica e biológica. É necessário mencionar que existem diferentes linhagens que pertencem à espécie *R. norvegicus*, isto é, animais de mesma espécie, mas que apresentam características que os diferenciam, dentro da mesma espécie, sejam elas genéticas, morfológicas e/ou funcionais.

Neste sentido, é preciso considerar diferenças existentes entre linhagens de ratos utilizados em pesquisas, as quais, uma a uma, podem expressar peculiaridades quanto à morfologia e à fisiologia do animal. O pesquisador deve conhecer essas particularidades para escolher o modelo animal mais adequado para responder suas dúvidas experimentais. Não é escopo deste capítulo definir todas as linhagens, mas considerar os aspectos comuns dos ratos de laboratório. Todavia, é importante destacar que o conhecimento prévio do tipo de linhagem e a forma de

acasalamento para manutenção das características genóticas e fenotípicas são essenciais para alcançar os resultados tecnicamente esperados.

Por exemplo, a linhagem Wistar (Figura 1), heterogênica, foi desenvolvida na Filadélfia pelo fisiologista norte-americano Henry Donaldson, em colaboração com o administrador científico Milton Greenam e a embriologista Henel Dean King no início do século XX. Trabalhos pioneiros do Instituto Wistar que deram o nome à linhagem que permitiu a padronização das características fenotípicas bem determinadas dos ratos Wistar, tais como orelhas alongadas, cabeça grande e o comprimento da cauda sempre menor do que o corpo. Além disso, o Instituto Wistar mostrou padrões bem delineados quanto à curva de crescimento, anatomia e fisiologia, o que naturalmente permitiu que esta linhagem se tornasse uma das mais utilizadas no mundo na pesquisa científica experimental.



Figura 1 – Ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar e Long-Evans

Fonte: Próprio autor.

A partir da linhagem Wistar, outras foram desenvolvidas para o estudo de diferentes doenças, a exemplo dos ratos espontaneamente hipertensos – *spontaneously hypertensive rat* (SHR), linhagem isogênica que permitiu o conhecimento de mecanismos envolvidos na gênese da hipertensão arterial. A linhagem heterogênica desenvolvida pelos pesquisadores Long e Evan em 1915, a partir do cruzamento de fêmeas Wistar albinas e rato cinza (*Rattus rattus*) de rua, originou a linhagem Long Evans (Figura 1) bem aceita para trabalhos que avaliam doenças oftálmicas, metabólicas, comportamentais, envelhecimento e toxicologia. Ainda há linhagens que podem ser heterogênicas ou isogênicas, como o rato obeso Zucker (Figura 2), que apresenta sintomas como polifagia, dislipidemia, hiperinsulinemia e obesidade, um fenótipo bastante semelhante ao paciente obeso.



Figura 2 – Rato (*Rattus norvegicus*) obeso Zucker

Fonte: Próprio autor.

De modo geral, os ratos são animais sociais e vivem naturalmente em grupos formados por várias fêmeas, machos jovens e um macho dominante. Em ambiente de laboratório, aceitam docilmente o alojamento em grupos pequenos de mesmo gênero. São animais predominantemente crepusculares ou noturnos, evitam ambientes abertos, altos e intensamente iluminados, são exploradores que apresentam padrão locomotor diverso com capacidade de caminhar, correr, escalar e pular. Os ratos apresentam capacidades sensoriais bem desenvolvidas, sobretudo olfato, audição e paladar, os quais são utilizados para adaptação destes a diferentes ambientes e com diferentes funções como cuidados com a prole, demarcação territorial, controle reprodutivo, entre outros.

A linhagem animal influencia diretamente nas características anatômicas e funcionais importantes, tais como a cor e a distribuição da pelagem, a sensibilidade às drogas e às moléculas tóxicas, o perfil hormonal, os padrões reprodutivos, a longevidade, a sensibilidade à dor e à anestesia, entre outros parâmetros.

Considerando as diferenças existentes entre as linhagens, é essencial que o experimentador selecione, com base nessas características, a melhor linhagem para o objetivo do estudo de interesse.

De modo geral, podemos compreender que o *R. norvegicus* compartilha em comum aspectos, como formato do corpo fusiforme, cauda longa que pode ser maior do que o comprimento do próprio corpo em algumas linhagens. Não possuem glândulas sudoríparas, o que os torna pouco habilidosos na termorregulação, além de não possuírem vesícula biliar.

Compreender aspectos básicos da fisiologia do animal utilizado é fundamental para o sucesso da pesquisa (Tabela 1). Por exemplo, a eficiência nutricional dos ratos é dependente da coprofagia. Além disso, o controle do crescimento dos dentes incisivos do animal é dependente do hábito de roer a ração, o que naturalmente mostra que a dieta oferecida deve ser consistente o suficiente para o animal roê-la.

Tempo médio de vida	2,5 – 3,5 anos*
Temperatura corporal (retal)	35,8 – 37,8°C*
Frequência cardíaca	250 – 500 batimentos por minuto*
Pressão sistólica	134 – 184 mmHg*
Pressão diastólica	58 – 88 mmHg*
Frequência respiratória	66 – 146 por minutos*
PO ₂	93,2 mmHg
PCO ₂	40 mmHg
pH	7,41
Massa corporal	
Ao nascimento	4 – 6g
Macho (adulto jovem)	250 – 500g*
Fêmea (adulto jovem)	250 – 325g*
Ingestão hídrica	10 – 21ml/100g de massa corporal
Ingestão alimentar	5 – 10g/100g de massa corporal
Maturidade sexual	
Machos	4 – 5 semanas de vida
Fêmeas	4 – 6 semanas de vida
Ciclo estral	4 a 5 dias
Tempo de gestação	19 a 21 dias
Número de filhotes por ninhada	6 – 12*

Tabela 1 – Parâmetros fisiológicos gerais de ratos (*Rattus norvegicus*) utilizados em pesquisa

*Esses valores representam animais adultos e dependem do tipo de linhagem observada e o modelo de reprodução (isogênica ou heterogênica).

O camundongo (*Mus musculus*) como modelo biológico para produção do conhecimento científico

Desde o início do desenvolvimento agrícola pela humanidade, registra-se a convivência com camundongos. Os primeiros registros mostram que a domesticação destes roedores ocorreu na Ásia, sobretudo, na Antiga China e no Japão, onde pela diversidade de cores e comportamentos peculiares, como os giros em volta do próprio corpo chamados de “valsa de ratos”, os tornaram desejados pela população da época. Naturalmente, ao longo dessa convivência entre humanidade e camundongos, na maior parte do tempo estes roedores foram vistos como pragas por sua capacidade de devorar grandes quantidades de alimentos e também transmitir doenças. No século XVIII, durante a época Vitoriana, estes pequenos roedores foram criados como animais de companhia, além de desejados por conta do comportamento e da variedade de cor da pelagem.

A partir do século XIX e início do século XX, o interesse pelos camundongos popularizou-se nos EUA e na Europa, principalmente na criação destes animais para exibição em clubes como animais sofisticados. O surgimento de fazendas de criação de camundongos, a partir de 1900, contribuiu para o conhecimento de aspectos importantes da anatomia, fisiologia, reprodução e comportamento destes roedores, isto é, as bases para o futuro estabelecimento do camundongo, como um importante modelo biológico para o estudo de diferentes áreas nas ciências biológicas e da vida.

O primeiro registro do uso de camundongos como modelo experimental foi feito pelo famoso cientista inglês, Robert Hooke, ao avaliar nestes animais os efeitos da pressão de ar no sistema respiratório. No início do século XX, a diversidade de cor na pelagem despertou a atenção de geneticistas, os quais confirmaram os princípios da genética mendeliana em camundongos. A partir da década de 1930, a produção comercial de camundongos se tornou estratégica para a “guerra americana contra o câncer”. Em 1937, o Dr. Clarence Cook Little, um dos dez geneticistas mais renomados da época, tornou-se símbolo da ideia de que animais de alto padrão genético seriam a melhor estratégia para se avançar nas pesquisas biomédicas, sobretudo no combate ao câncer.

Além disso, a necessidade de produção destes animais em escala industrial por empresas especializadas se tornou uma exigência para atender a demanda da pesquisa e a manutenção do padrão genético dos animais,

sobretudo, nos EUA.

Curiosamente, o Sr. Roscoe Jackson, fundador da empresa automobilística Hudson e um dos vários financiadores do Dr. Little, concordava que a produção padronizada de animais para as pesquisas biomédicas deveria se assemelhar à linha de produção da indústria automobilística. Naturalmente, com apoio do setor industrial de Detroit e com a visão científica aguçada, o Dr. Litter fundou em 1929, o *Jackson Laboratory*, um complexo industrial para produção e venda de camundongos padronizados para os EUA, especialmente, para as investigações sobre o câncer. O laboratório Jackson impulsionou as ciências biomédicas, a partir do conhecimento e da manipulação genética de camundongos e a criação do padrão na criação e manutenção de animais de laboratório.

Embora vermes, fungos e insetos como a mosca da fruta (*Drosophilla melanogaster*) sejam utilizados para identificação do papel de genes específicos no desenvolvimento de diferentes doenças, a comunidade científica considera o uso de mamíferos uma estratégia mais segura para compreensão destes mecanismos e sua comparação com humanos. Neste sentido, camundongos são amplamente utilizados como modelos genéticos para o estudo de diferentes doenças como câncer, síndrome metabólica, envelhecimento, diabetes *mellitus* (DM) e obesidade. Neste cenário, nas últimas décadas, o número de estudos utilizando camundongos como modelo biológico tem crescido significativamente, principalmente, a partir da engenharia genética, em meados da década de 1980.

Na década de 1970, 20% dos animais utilizados na pesquisa em neurofisiologia e neurofarmacologia eram camundongos. A partir do conhecimento da tecnologia do DNA recombinante e o surgimento de ferramentas de biologia molecular que permitiram a manipulação do genoma de camundongos a partir de 1987, este número alcançou a média de 50% nas últimas décadas. Não há dúvida de que o sequenciamento do genoma humano e também de camundongos, além de ter revelado alta homologia genética entre essas espécies (>90%), subsidiou o rápido progresso da engenharia genética e o surgimento de técnicas de biologia molecular que permitiram o desenvolvimento controlado de modelos genéticos para diferentes doenças humanas.

É preciso destacar o sucesso das técnicas de engenharia genética como a deleção, inativação ou a introdução de genes ao genoma animal, sobretudo em camundongo. Atualmente, há uma variedade expressiva de modelos genéticos em camundongos para diferentes doenças humanas, como o camundongo não obeso e diabético (NOD) utilizado como modelo genético espontâneo para o DM tipo 1, o camundongo db/db (figura 03) utilizado como modelo genético espontâneo para o DM tipo 2, o camundongo ob/ob conhecido desde a década de 1950 como modelo genético espontâneo para a obesidade, ou o camundongo *nude* (*Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}*) descrito pela primeira vez em 1966 em Edimburgo por Flanagan. Estes animais, além de não terem pelos, apresentam agenesia do timo, conseqüentemente produção reduzida ou ausente de linfócito T CD4⁺ e CD8⁺, o que os torna severamente imunocomprometidos, razão pela qual são utilizados nos estudos que buscam compreender os mecanismos imunomediados no desenvolvimento de doenças de interesse humano, a exemplo do câncer e transplantes heterólogos.

Além destes modelos genéticos espontâneos, a engenharia genética permite alterações no genoma animal através de inserção, modificação ou inativação de um ou mais genes, o que naturalmente oferece a possibilidade de produzir modelos biológicos virtualmente para qualquer doença de interesse.

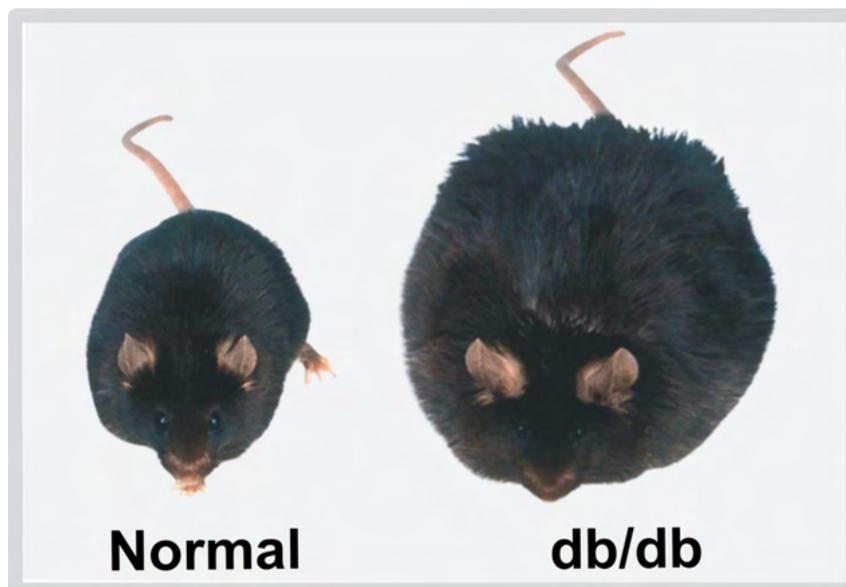


Figura 3 – Camundongo (*Mus musculus*) db/db

Fonte: Próprio autor.

Dentre os modelos genéticos, os mais comumente encontrados são o animal transgênico, no qual é inserido um segmento de DNA estranho ao genoma original; o animal *knockout* (KO) em que um gene de interesse é inativado ou deletado ou um gene cuja expressão é modificada produzindo variações da proteína expressa (em quantidade e/ou função) pelo gene-alvo (*knock in*) capazes de produzir o fenótipo desejado. As possibilidades, a partir desta tecnologia e a facilidade com que é empregada em camundongo quando comparado a outros animais, torna esta espécie preferencialmente a primeira escolha para o estudo de mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento de diferentes doenças.

Outros fatores explicam esse crescente uso de camundongos na pesquisa biomédica, além das similaridades quanto à fisiologia e biologia celular, também aspectos práticos que envolvem custo de produção e manutenção dos animais em biotérios, menor consumo de insumos e ração quando comparados a outras espécies de animais e ciclo rápido de vida (longevidade).

É fundamental o conhecimento de aspectos básicos da fisiologia do camundongo (Tabela 2) para a escolha desta espécie e suas diferentes linhagens como modelo experimental. De modo geral, camundongos são animais sociáveis que vivem em grupos formados por um macho dominante e outros machos submissos associado a fêmeas reprodutoras. A permanência em comunidades é fundamental para o desenvolvimento de comportamentos típicos da espécie, como explorar o ambiente, escalar, roer, pular e perseguir, bem como atividades reprodutivas. O isolamento social contribui decisivamente para o surgimento de comportamentos semelhantes à depressão e ansiedade, agressividade, comprometimento do comportamento sexual e estereotípias, como giros, lambedura e pulos repetitivos.

São animais crepusculares, evitam espaços abertos e buscam proteção, permanecendo sempre próximos a anteparos como paredes. Apresentam olfato bastante desenvolvido e interpretam odores como elemento de interação social como a demarcação de território, função sexual, cuidado parental. Camundongos são extremamente territorialistas cujo domínio é exercido pelo macho dominante, através das fezes e urinas. Nas criações de camundongos, a causa mais comum de morte são as brigas em função do estresse ambiental ou disputa por territórios com o macho dominante.

Outro elemento de interação são as vocalizações amigáveis em frequência ultrassônica dada à aguçada capacidade auditiva destes animais. Neste aspecto, ruídos e vibrações em excesso podem ser extremamente prejudiciais aos camundongos, predispondo-os a crises epiléticas audiogênicas, redução da capacidade

reprodutiva e perda da acuidade auditiva. Ao contrário, são animais de baixa visão e extremamente sensíveis à luz. Diante do crescimento constante dos dentes incisivos a uma taxa de 1 a 2mm por semana, é fundamental que se ofereça elementos para a roedura e manutenção do bem-estar animal.

Tempo médio de vida	1.5 a 2.5 ano
Temperatura corporal (retal)	37,1 - 39,0°C
Frequência cardíaca	450 – 700 batimentos por minutos*
Pressão arterial média (PAM)	93 – 103 mmHg*
Sistólica (PS)	110 – 117 mmHg*
Diastólica (PD)	75 – 85 mmHg*
Frequência respiratória	106 – 230 min ⁻¹
PO ₂	35,0 mmHg
PCO ₂	78 – 84 mmHg
pH	7,37
Massa corporal	
Ao nascimento	1 – 1,5g
Machos (adulto jovem)	35 – 40g*
Fêmeas (adulto jovem)	30 – 35g*
Ingestão hídrica	15 – 21g/100g de massa corporal
Ingestão alimentar	12 – 18g/100g de massa corporal
Maturidade sexual	
Machos	5 – 7 semanas de vida*
Fêmeas	4 – 5 semanas de vida
Ciclo estral	4 a 5 dias*
Tempo de gestação	19 a 21 dias*
Número de filhotes por ninhada	10 – 12*

Tabela 02 – Parâmetros fisiológicos gerais de camundongos (*Mus musculus*) utilizados

Esses valores representam animais adultos e dependem do tipo de linhagem observada e o modelo de reprodução (isogênica ou heterogênica).

CONCLUSÃO

Naturalmente, ratos e camundongos são os animais mais utilizados na pesquisa biomédica no mundo. Entretanto, é preciso considerar que são espécies distintas, do ponto de vista evolutivo, genético e funcional. Neste sentido, reconhecer as diferenças e, também, as similaridades entre essas espécies, torna mais segura a escolha para o modelo animal a ser desenvolvido (modelos genéticos) ou utilizados na pesquisa científica na geração de resultados experimentais reprodutíveis e confiáveis. Além da escolha da espécie, é necessário considerar as diferentes linhagens existentes, como modelo ideal para o objetivo proposto.

O reconhecimento destas necessidades contribui para o experimentador realizar a pesquisa baseada na ideia central da bioética: refinar os métodos empregados, reduzir o número de animais utilizados e substituí-los sempre que possível por métodos alternativos.

Independentemente da espécie e/ou linhagens escolhidas, a utilização de animais na experimentação científica, não somente de mamíferos, envolve um delineamento experimental e estatístico bem feito, associado à utilização de metodologias padronizadas que permitam a produção de resultados confiáveis para se evitar repetições desnecessárias de experimentos e o uso excessivo de animais.

REFERÊNCIAS

BRESCHI, A.; GINGERAS, T. R.; GUIGÓ, R., **Comparative transcriptomics in human and mouse**. v. 18, n. 7, p. 425-440. DOI: 10.1038/nrg.2017.19, 2017.

DEINUM EE, HALLIGAN DL, NESS RW, ZHANG YH, CONG L, ZHANG JX, KEIGHTLEY PD. Recent Evolution in *Rattus norvegicus* Is Shaped by Declining Effective Population Size. **Mol. Biol. Evol.**, v. 32, n. 10, p. 2547-2558, 2015.

ELLENBROEK, B.; YOUN, J. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? **Dis Model Mech.**, v. 9, n. 10, p. 107-

108, 2016.

FRANK KOENTGEN, GABRIELE SUESS, DIETER NAF. 2010. Engineering the mouse genome to model human disease for drug discovery. **Methods Mol Bio.**, v. 602, p. 55-77. DOI: 10.1007/978-1-60761-058-8_4

GILL T.J. SMITH, G.J., WISSLER R.W., KUNZ, HW. Rats as an experimental animal. **Science.**, v. 21, n. 245-4915), p. 269-76, 1989. DOI: 10.1126/science.2665079.

HOWES LG AND LOUIS WJ. Genealogy of the spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat strains: implications for studies of inherited hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 7, S1 – S5, 1990.

JACOB HJ, KWITEK AE. 2002. Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. **Nat Rev Genet.**, v. 3, n. 1, p. 33-42, 2002. DOI: 10.1038/nrg702.

KERCMAR, J.; TOBET, S. A.; MAJDIC G. 2014. Social isolation during puberty affects female sexual behavior in mice. **Front Behav Neuro.**, v. 29, p 337. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00337.

KHLYAP L, GLASS G, KOSOY M. Rodents in urban ecosystems of Russia and the USA. In: TRIUNVERI, A.; SCALISE, D. (Ed.). *Rodents: Habitat, Pathology and Environmental Impact*. Hauppauge, NY: Nova Scientific Publishers, p. 1-22, 2012.

KOSOY M, KHLYAP L, COSSON JF, MORAND S. 2015 Aboriginal and invasive rats of genus *Rattus* as hosts of infectious agents. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 15, n. 1, p. 3-12, 2015.

KRISTINA RYDELL-TÖRMÄNEN, JILL R JOHNSON. The Applicability of Mouse Models to the Study of Human Disease. **Methods. Mol Biol.** 2019 -1940, p. 3-22. DOI: 10.1007/978-1-4939-9086-3_1.

LIN XD, GUO WP, WANG W, ZOU Y, HAO ZY, ZHOU DH, DONG Z, QU YG, LI MG, TIAN HF, WEN JF, PLYSNIN A, XU J, ZHANG YZ. Migration of Norway rats resulted in the worldwide distribution of Seoul hantavirus today. **J. Virol.**, v. 86, n. 2, p. 972-981, 2012.

LOGAN et al., 2019 Commercial Rodents in America: Standard Animals, Model Animals, and Biological Diversity. **Rrain Behav Evol.**, v. 93, n. 2-3, p. 70-81. DOI: 10.1159/000500073. Epub 2019 Aug 15.

NAKANISHI S, KURAMOTO, T., KASHIWAZAKI N, YOKOI N. 2017. Genetic profiling of two phenotypically distinct outbred rats derived from a colony of the Zucker fatty rats maintained at Tokyo Medical University. **Exp Anim.**, v. 66, n. 2, p. 91-98, 2017.

VANHOOREN. V., LIBERT, C. The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities. **Ageing Res Rev.** V. 12, n. 1, p. 8-21, 2013.

CAPÍTULO 5

ASPECTOS REPRODUTIVOS GERAIS DE RATOS E CAMUNDONGOS

Data de aceite: 01/03/2022

Dayane Aparecida Gomes

Profa. Dr.^a Universidade Federal de Pernambuco

Ismaela Maria Ferreira de Melo

Dra. Universidade Federal Rural de Pernambuco

INTRODUÇÃO

A produção dos animais de laboratório, como os ratos e camundongos, é delineada para atender às solicitações dos pesquisadores, respeitando o espaço físico disponível para essa finalidade, a fim de evitar acasalamentos desnecessários e minimizar a produção de animais excedentes.

Ratos e camundongos fêmeas são mamíferos poliestrais, que ovulam durante todo o ano. As suas características reprodutivas são semelhantes, contudo, de acordo com a linhagem, podem variar dentro da mesma espécie. Além disso, o desempenho sexual e reprodutivo é altamente influenciado pelo ambiente, sanidade e nutrição nos quais eles se encontram.

Nessas espécies, a sensibilidade olfativa e auditiva atua diretamente no processo reprodutivo dado, por exemplo, que os feromônios, proteínas liberadas pela urina, saliva e pele, que podem sincronizar o ciclo estral de fêmeas alojadas em grupo e provocar anestro, quando as fêmeas permanecem na ausência do odor dos feromônios dos machos, outro meio de sincronização é o método Whitten, nele as fêmeas são agrupadas em grupos homossexuais com anestro ou diestro prolongado, após isso, são expostas a um macho ou ao odor de sua urina, acarretando nas fêmeas a liberação de gonadotrofina e ativação do ciclo ovariano de forma

sincronizada. Em relação à audição, aos ruídos e às vibrações maiores que 85dB, aumentam a mortalidade dos filhotes, reduzem consideravelmente a eficiência reprodutiva e o número de filhotes nascidos. Além disso, uma nutrição inadequada com limitação calórica e uma constante exposição a variáveis ambientais de temperatura, umidade e ventilação podem ser prejudiciais, uma vez que estas espécies apresentam metabolismo extremamente acelerado e não se adaptam a mudanças ambientais bruscas, levando a interrupção do ciclo estral e atraso na maturidade sexual.

Algumas pesquisas requerem do pesquisador o conhecimento do período gestacional. Aprender a reconhecer o ciclo estral na fêmea é essencial para a disponibilidade confiável de gestações experimentais. Para a maioria dos objetivos, ratos e camundongos machos e fêmeas jovens de 8-12 semanas no pico de sua fertilidade são usados para otimizar a reprodução e para experimentos que envolvem o controle ou detalhamento do período gestacional.

LINHAGEM GENÉTICA E REPRODUÇÃO

O sistema de reprodução de ratos e camundongos utilizados em pesquisas científicas é determinado de acordo com as características genéticas dos modelos animais. Atualmente, a classificação genética das espécies se baseia nos programas de acasalamento utilizados. Estes definem a forma de transmissão dos caracteres genéticos. A partir deste entendimento se têm dois grandes sistemas:

1. Linhagens que resultam de acasalamentos entre irmãos, provenientes de pais monogâmicos permanentes são denominados animais isogênicos (do inglês

inbred);

2. Linhagens que resultam de acasalamentos ao acaso cujos animais provenientes destes acasalamentos são denominados animais heterogêneos (do inglês *outbred*).

ANIMAIS ISOGÊNICOS (*INBRED*)

Os animais isogênicos são o resultado de 20 gerações consecutivas do acasalamento entre irmãos, a partir de casais monogâmicos permanentes denominados de casais de fundação, obtendo-se assim um nível de 99% de homozigose, ou seja, cada classe isogênica apresenta um único grupo de características que as diferencia entre si. Este grupo de características que constitui cada linhagem é formado por genes que sofrem menor ou maior grau de influências ambientais. Esses animais apresentam maior vulnerabilidade a doenças e menor desempenho reprodutivo comparado com as linhagens heterogêneas. Além disso, com a utilização dessa linhagem, diminui-se o número de animais usados e a necessidade de repetição do experimento.

ANIMAIS HETEROGÊNEOS (*OUTBRED*)

Exibem alta heterozigidade e são acasalados de modo a se evitar a consanguinidade (que normalmente não deverá exceder 1% em cada geração nascida), a fim de se preservar a variabilidade genética. O objetivo dos animais heterogêneos é preservar um alto grau de variação biológica individual na população.

Por todo o mundo, diferentes empresas são especialistas no desenvolvimento e manutenção de animais para utilização em pesquisas científicas. O padrão de cruzamento segue protocolos rígidos e a escolha da espécie dependerá do objetivo do estudo a ser desenvolvido. A tabela 1 mostra os principais animais isogênicos e heterogêneos utilizados em pesquisas.

LINHAGENS DE RATOS	
RATOS ISOGÊNICOS (<i>INBRED</i>)	RATOS HETEROGÊNICOS (<i>OUTBRED</i>)
Rato Brow Norway	Rato CD® IGS
Rato Copenhagen <i>Rat</i>	Rato CD® <i>Hairless</i> (sem pelos)
Rato Fischer	Rato Long-Evans
Rato F344	Rato Sentinela
Rato Lewis	Rato Sprague Dawley®
	Rato Wistar
	Rato Wistar Han IGS
LINHAGENS DE CAMUNDONGOS	
CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS (<i>INBRED</i>)	CAMUNDONGOS HETEROGÊNICOS (<i>OUTBRED</i>)
129-Elite Mouse	Camundongo <i>Black Swiss</i>
A/JCr Mouse	Camundongos CD-1® IGS
B6 albino mouse	Camundongos TM
BABL/c mouse	Camundongos SKH1-Elite
DBA/2 mouse	Camundongos Sentinela
FVB mouse	Camundongos CFW®
C3H mouse	Camundongos Cr:ORL Sencar
SJL-Elite mouse	
C57BL/6 mouse	

Tabela 1 - Principais ratos e camundongos isogênicos e heterogêneos

Fonte: Elaborado pelos autores

FISIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR

Maturação Sexual nos roedores

Ratos e camundongos representam os modelos animais mais utilizados para pesquisas, em função da vantagem de apresentar um ciclo reprodutivo bastante curto e função testicular de espermatogênese e produção de hormônios esteroides semelhantes aos dos seres humanos. Roedores machos são os animais de preferência em trabalhos de pesquisa, visto que eles não apresentam os possíveis efeitos decorrentes das variações fisiológicas, nos níveis dos hormônios gonadais que ocorrem durante o ciclo estral das fêmeas.

Semelhante ao homem, o gene SRY, presente no braço curto do cromossomo Y, é o gene responsável pela formação dos testículos. A descida dos testículos da cavidade abdominal para a bolsa escrotal ocorre antes da puberdade por volta de 29 a 30 dias de idade. A puberdade nos machos ocorre por volta dos 50 dias de idade, quando aparecem as espermátides maduras nos testículos e os primeiros espermatozoides na cauda do epidídimo, bem como se dá o início da síntese e secreção da testosterona.

Ratos e camundongos fêmeas apresentam peso menor em comparação aos machos desde o nascimento. A maturidade sexual ocorre em torno dos 60 dias de idade, no entanto, a idade mais usual para o acasalamento em biotérios acontece aos 90 dias.

Ciclo Estral nas Fêmeas

O ciclo estral dos roedores dura em torno de 4 a 5 dias, compreendendo quatro fases divididas em proestro, estro, diestro e metaestro. A tipologia celular, dentro do canal vaginal, pode ser avaliada através da observação citológica dos esfregaços vaginais das fêmeas, nesse ponto, a proporção de células escamosas, células epiteliais nucleadas e leucócitos é o que determina a fase do ciclo estral na qual elas se encontram. Os efeitos do estrogênio e da progesterona determinam as mudanças citológicas observadas no canal vaginal.

No início do proestro, observa-se o desenvolvimento dos folículos ovarianos acompanhado do aumento dos níveis de estrogênio, podendo durar entre 12 e 18 horas. Neste momento, no esfregaço vaginal, prevalecem às células epiteliais nucleadas que podem estar em grupos ou individualizadas e não há a presença de leucócitos (Fase 1, Figura 1).

Após o proestro, segue-se o estro, um intervalo breve com duração aproximada de 12 horas, durante o qual a fêmea aceita o macho e durante o qual ocorre a ovulação. Nesta fase é evidente a presença de células epiteliais escamosas anucleadas, provenientes da descamação da superfície epitelial da vagina (Fase 2, Figura 1).

O metaestro é caracterizado pela presença marcante no esfregaço vaginal de leucócitos pequeno e de núcleo irregular, os quais são intensamente corados (Fase 3, Figura 1) e células epiteliais ou escamosas em menor número. Esta fase dura em torno de 10 a 14 horas. Em seguida, ocorre o diestro, que é a fase mais longa do ciclo estral, e na qual os efeitos da progesterona predominam e é o momento, no qual os folículos ovarianos iniciam o seu desenvolvimento. Neste momento, a célula mais numerosa no esfregaço vaginal são os leucócitos (Fase 4, Figura 1).

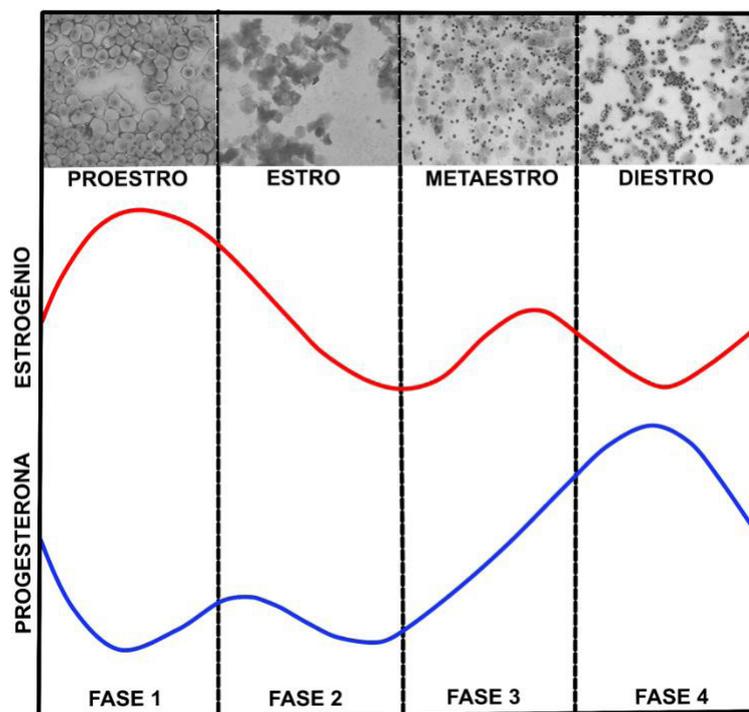


Figura 1 – A avaliação citológica de esfregaços vaginais pode ser usada para identificar as fases do ciclo estral

Fonte: Próprio autor.

FORMAÇÃO DE COLÔNIAS E ESQUEMAS DE ACASALAMENTO

A alta demanda de uso de ratos e camundongos, em pesquisas associada aos elevados custos com manutenção de espaços físicos e manejo adequado destes animais, faz com que seja necessário aperfeiçoar a sua produção nos biotérios. Os grandes criadores utilizam um modelo formado por três extratos de colônia: fundação, expansão e criação/produção.

A colônia de fundação tem o objetivo de preservar o material genético o mais semelhante possível aos dos exemplares que a originaram. Neste caso, os cruzamentos devem ser monogâmicos, propiciando controle do patrimônio genético e precisão dos níveis de produtividade. A colônia de expansão é formada a partir da colônia de fundação, geralmente, ela é poligâmica e sua produção pode suprir diretamente os laboratórios de pesquisa, ou fornecer reprodutores para a colônia de produção no caso de grandes biotérios.

Dois esquemas de criação diferentes são mais utilizados para o acasalamento de roedores na experimentação animal. Os ratos e camundongos são geralmente acasalados de forma monogâmica (um macho e uma fêmea) ou em trios (um macho, duas fêmeas em cada gaiola).

PARES MONOGÂMICOS

Esquema 1: O macho é removido após o nascimento da ninhada

Um macho e uma fêmea são alojados juntos para o acasalamento. O macho não é retirado quando a fêmea fica prenhe ou grávida ou dá à luz aos filhotes. Para fornecer mais espaço para os filhotes, o macho é removido na primeira troca de gaiola após o parto. Este modelo permite que a fêmea se torne novamente fértil, a partir do estro que ocorre nas primeiras 24 horas após o parto, mesmo amamentando os filhotes e nesse caso, é essencial a presença do macho nesse período de tempo. As ninhadas nascem com aproximadamente 21 dias de intervalo. A ninhada de três semanas deve ser desmamada antes do nascimento da nova ninhada.

Esquema 2: O macho é removido antes da ninhada nascer

O macho é removido antes da ninhada nascer: um macho e uma fêmea são alojados juntos para o acasalamento. Quando a fêmea está visivelmente grávida, o macho é retirado da gaiola, impedindo a cópula no cio pós-parto, permitindo o descanso das matrizes durante o período de lactação e possibilitando o uso dos machos reprodutores na fecundação de outras fêmeas.

ACASALAMENTO MONOGÂMICO PERMANENTE

Neste método de acasalamento, o casal permanece na produção por sete ou mais partos consecutivos, ou seja, permanecem juntos em média por um ano, o cruzamento ocorre geralmente já no cio pós-parto, assim sendo, as matrizes iniciam uma nova gestação durante a lactação. Estudos relatam que esse sistema em relação ao poligâmico acarreta menor tempo para o desmame dos filhotes, no entanto necessita do dobro do espaço e do número de machos reprodutores.

ACASALAMENTO POLIGÂMICOS

Este método abriga em uma gaiola duas fêmeas e um macho reprodutor (permanentes). Quando a fêmea engravida, é separada do macho. Ela dá à luz seus filhotes e os amamenta por 21 (ou até 28 dias, a depender do protocolo de desmame utilizado no biotério). Apenas uma fêmea lactante e uma ninhada são permitidas por gaiola. Depois que os filhotes são desmamados, a fêmea pode ser devolvida à gaiola com o macho.

ACASALAMENTO POLIGÂMICOS TEMPORÁRIO

Neste esquema, é utilizado um par de matrizes por gaiola mantidas por cinco ciclos reprodutivos em sistema rotativo de macho. Neste sistema, o macho permanece na gaiola até a certificação da cópula nas duas matrizes e, em seguida, é retirado da gaiola, retornando após o desmame das duas ninhadas.

VERIFICAÇÃO DA GRAVIDEZ E NASCIMENTO

As fêmeas apresentam o tampão copulatório, também conhecidos como tampão vaginal, que é de difícil visualização em ratas, pois ocorre no interior do vestíbulo vaginal, ele se forma de 3 a 8 horas após a cópula e permanece nesse local, por cerca de 24 horas.

O veterinário ou técnico responsável pelo biotério deve verificar a gravidez e o nascimento e registrar esses eventos no(s) cartão(ões) da gaiola. Quando a ninhada nasce, a gaiola é sinalizada com um novo cartão de ninhada e a data de nascimento, bem como a data do desmame projetadas são documentadas.

APÓS O NASCIMENTO

Depois que os filhotes nascem, a gaiola não pode ser trocada por pelo menos três dias, exceto para reposição de comida e água conforme necessário. Caso a forração, “cama”, da gaiola fique muito suja ou molhada e a gaiola precise ser trocada mais cedo, o seguinte procedimento será seguido:

- A fêmea é transferida primeiro;
- Em seguida, uma pequena quantidade de cama suja é inteiramente recolhida com uma mão enluvada e transferida para a nova gaiola, de modo que o cheiro na nova gaiola será familiar;
- O mesmo procedimento é seguido até que os filhotes comecem a se mover ao redor de toda a gaiola.
- Muitos protocolos orientam que logo após o nascimento deve ser deixado no máximo oito animais com a mãe, para que não haja competição por alimento, dessa forma, todos os animais obtêm os nutrientes necessários para um crescimento uniforme. Alguns estudos também preconizam protocolos

em que a ninhada em amamentação deve ser composta de machos e fêmeas.

DESMAME

O desmame em geral ocorre com 21 dias, época na qual os animais já se alimentam de ração de forma independente e se movimentam livremente na gaiola. No entanto, dependendo do estudo experimental, os animais podem ser desmamados antes, principalmente, em pesquisas que relacionam à nutrição e/ou à desnutrição. Ademais, o ideal é que os filhotes sejam desmamados com o peso mais elevado e homogêneo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva e sistemas de acasalamentos de ratos e camundongos é essencial em vários âmbitos da pesquisa científica, inicialmente pelos pesquisadores, que devem ter plena consciência do número de animais que serão necessários para execução do seu experimento, evitando assim eutanásias não necessárias. Além disso, é essencial para os ensaios que irão tratar diretamente com a fisiologia reprodutiva, impossibilitando conclusões imprecisas, e por fim, para o bem-estar dos animais que não devem ser expostos aos estresses do período gestacional de forma indevida.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Antenor, PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos. (Org.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação [on-line]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Disponível em: **SciELO Books**.
- BRAGA, L. M. G. M. Braga Controle reprodutivo em biotérios de criação de animais de laboratório com ênfase em roedores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, p. 105-109, 2017.
- BROOK, P. F. *et al.* Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. **Fertil Steril**, v.75, p. 269-274, 2001.
- BYERS, S. L. *et al.* Mouse estrous cycle identification tool and images, **PLoS ONE**, v. 7, e35538, 2012.
- CALIGIONI, C. S. **Assessing Reproductive Status/Stages in Mice**. John Wiley & Sons, Inc., 2001. [On-line]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/0471142301.nsa04is48>.
- DAGNÆS-HANSEN, F. Laboratory animal genetics and genetic monitoring. In: Svendsen, P.; Hau, J. **Handbook of laboratory animal science**. Boca Raton: CRC, 1994. Cap.10. p.89-124.
- FREITAS, Fernando.; MENKE, Carlos Henrique.; RIVOIRE, Waldemar Augusto.; PASSOS, Eduardo Pandolfi. Diferenciação sexual. Rotinas em ginecologia. 5. ed. Porto Alegre: Editora: Artmed; 2001. p. 584.
- GUÉNET, J. L. *et al.* **Genetics of the Mouse**. Berlin: Springer, 2015. 408 p.
- HUCKINS, C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. **The Anatomical Record**, v. 190, p. 905-926, 1978.
- KNOBIL, E.; NEIL, J. D. The physiology of reproduction. 2nd ed. Editora. New York: Raven Press; 1994.
- TORAL, LEONARDO DELGADO. **Identificación del ciclo estral**. 2017. Tesis (Maestro en Ingeniería Electrónica) Opción Instrumentación Electrónica. Facultad de Ciencias de la Electrónica Maestría en Ingeniería Electrónica. 2017.
- MATTARAIA, VÂNIA GOMES DE MOURA.; LAPCHIK, VALDEREZ BASTOS VALERO. Rotina de manejo das espécies. In: LAPCHIK, V. B. V. *et al.* **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. Cap.17, p.251-262.
- MATTARRAIS, V. G. M.; MOURA, A. S. A. M. T. Productivity of wistar rats in different mating systems. **Ciência Rural**, v. 42, p. 1490-1496, 2012.

RASIA-FILHO, A. A.; LUCION, A. B. Effects of 8-OH-DPAT on sexual behavior of male rats castrated at different age. **Hormones and Behavior**, v. 30, p. 251-258, 1996.

RASMUSSEN, S. *et al.* Construction Noise Decreases Reproductive Efficiency in Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Scienci**, v. 48, p.363-370, 2009.

RODRÍGUEZ de la Cruz, R. M.; PÁSARO DIONISIO, M. R. Control endocrino del ciclo reproductor en la rata: Una experiencia docente utilizando un método de caracterización citológico. **Revista de Enseñanza Universitaria**, p. 545-554, 1998.

SILVÂNIA M. P. NEVES, JORGE MANCINI FILHO, ELIZABETE WENZEL DE MENEZES. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Instituto de Química (FCF-IQ/USP), 2013.

MATTARAIA, Vania Gomes de Moura. **Eficiência reprodutiva de ratos wistar: sincronização, restrição alimentar e sistema de produção**. 2007. Tese (Doutorado). – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

WHITTEN, W. K. Modification of the estrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. **The Journal of Endocrinology**, v. 13, p. 399-404, 1956.

CAPÍTULO 6

ANESTESIA, ANALGESIA E EUTANÁSIA DE ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Data de aceite: 01/03/2022

Ismaela Maria Ferreira de Melo

Dra. Universidade Federal Rural de Pernambuco

INTRODUÇÃO

PRINCÍPIOS GERAIS DA ANALGESIA E ANESTESIA EM ROEDORES

Dor: Definição e Aspectos Fisiológicos

A dor pode ser definida como uma experiência subjetiva de dano em uma parte do corpo. A *International Association for the Study of Pain* (1986), define-a como sendo uma sensação desagradável e uma experiência emocional associada a um dano tecidual em potencial ou real. Os estímulos dolorosos tanto em humanos quanto em animais ocorrem por mecanismos nervosos semelhantes, deixando claro que estes não são tolerantes à dor. Por sua vez, ela tem um papel protetor essencialmente importante, advertindo sobre ameaças e assegurando à conservação da integridade e preservação da homeostasia corporal.

A dor pode ser classificada em aguda ou crônica. A aguda é o resultado da estimulação do sistema somatossensorial por estímulos nociceptivos de elevada intensidade, que não persiste por mais de três meses. Ela acontece devido a uma lesão traumática, no contexto de uma condição médica subjacente ou secundária a um tratamento. Todavia, quando ela persiste por longos períodos de tempo, seja como acompanhamento a um processo de doença, ou seguindo a quantidade usual de tempo esperado para cicatrizar é chamada de dor crônica que é caracterizada como um estado patológico, no qual há uma disfunção do sistema somatossensorial,

nesse caso, a dor persiste além da remoção da sua causa, não sendo simplesmente um sintoma de uma lesão ou doença, mas um problema médico por direito próprio. Ela descreve uma síndrome caracterizada por dor física persistente, deficiência, distúrbio emocional e sintomas de abstinência social.

Como consequência da dor, ocorrem várias alterações fisiológicas que interferem nos eixos neuroendócrinos, elevando os níveis de aldosterona, cortisol e catecolaminas, podendo ocasionar mudanças nos resultados da pesquisa. Assim, o pesquisador tem por obrigação e por ética impedir a dor em qualquer experimento com animais.

Fisiologicamente, a via nociceptiva, que encaminha os sinais da periferia para o cérebro onde a dor é percebida, pode ser dividida em quatro componentes: Transdução de estímulos nocivos na periferia; transmissão desse estímulo ao Sistema Nervoso Central (SNC); integração central e modulação dos sinais ao nível do SNC; e por fim, a projeção no cérebro seguida pela percepção. Assim, podemos resumir esse mecanismo da seguinte forma: Os nociceptores são neurônios aferentes primários que se projetam de tecidos, incluindo pele, músculo, articulações e vísceras da medula espinhal ou seu equivalente trigêmeo no tronco cerebral. Quando há um sinal de dor, através da liberação de substâncias no local lesionado, há um estímulo desses receptores de dor que encaminham sinais para a medula espinhal que os comunica ao cérebro, através de neurônios e células gliais. Ao atingirem o cérebro, esses sinais são direcionados por vias sensitivas ao córtex cerebral. Essa área do cérebro decidirá qual reação o corpo executará a esse estímulo. Ademais, outro sistema que recebe e interpreta sinais é a rede silente, essa rede “percebe” que a dor poderá expor o corpo a algum risco e se ativa,

gerando a sensação de dor e uma resposta como um susto ou alerta.

O cérebro também se sensibiliza, enviando sinais para estimular o indivíduo a reagir ou retirar imediatamente o membro ou parte do corpo que está provocando a dor. Esses mesmos sinais ativam redes de modulação que promovem a secreção de endorfina e encefalinas, auxiliando na regulação e redução da dor. Esses mecanismos são iguais para todos os indivíduos, o que difere é a sensibilidade e a eficácia.

Um fator relevante é que na dor aguda, a condução do estímulo se dá pelo trato neoespinalâmico, formados por fibras nervosas de condução rápida (A-delta). Contudo, na crônica, a ascensão do estímulo nociceptivo ocorre pelo trato paleoespinalâmico, constituído por fibras de condução lenta (C), esse trato é polissináptico, de forma que distribui a informação dolorosa para vários níveis do sistema nervoso central e periférico, resultando em uma ampla possibilidade de modulação da dor.

IMPORTÂNCIA DA ANESTESIA E ANALGESIA EM ROEDORES

É sabido que os animais de fato sentem dor e que ela resulta em alterações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais significativas e indesejáveis tanto para os animais quanto para os estudos científicos. O controle efetivo da dor pós-operatória deve estar sempre entre os principais objetivos dos laboratórios de experimentação.

Nos animais de laboratório, os parâmetros para avaliar a dor e a angústia são diferentes dos humanos, dentre eles estão o peso corporal, mobilidade, vocalização, volume minuto da respiração e comportamento, sendo imprescindível que se conheça a biologia destes animais antes do experimento. A expressão do estado de saúde se dá pelo comportamento dos indivíduos quando estes se encontram isolados ou em grupos, por esse motivo é necessário conhecer as características comportamentais de cada espécie utilizada em pesquisas científicas, auxiliando nas avaliações diárias no desenvolvimento da pesquisa.

A presença da dor permite que o animal apresente um retardo no processo de cura, decréscimo na ingestão de alimentos e aumento no consumo de energia, gerando dessa forma um quadro energético negativo, com retardo na recuperação pós-anestésica, respiração menos eficiente e maiores complicações no pós-operatório.

Embora a dor sirva como uma função protetora para avisar ao corpo de danos, a dor cirúrgica, quando não tratada, pode ocasionar diminuição da resposta imunológica e conseqüentemente propiciar maior risco de infecções secundárias. Além disso, ocorre um aumento na produção de catecolaminas, liberação prolongada na circulação de epinefrina e norepinefrina que leva a taquicardia e hipertensão, alterando assim as funções do fígado, pâncreas e rins; sucede-se também, o aumento da secreção dos hormônios hipofisários e a elevação e/ou diminuição de TSH, FHS e LH. Esse quadro resulta em efeitos na secreção de hormônios em órgãos-alvo, incluindo o córtex adrenal (aumento do cortisol e aldosterona), pâncreas (diminuição da insulina e aumento do glucagon) e tireoide (diminuição da tiroxina). A consequência geral é o aumento do catabolismo, mobilização de reservas energéticas, retenção de sal e água, a fim de manter o volume de fluido e a homeostasia cardiovascular. Dessa forma, é de fundamental importância uma equipe qualificada para o reconhecimento dos seus sinais e a presença de um veterinário, o qual é responsável pelo reconhecimento, controle e monitoramento na espécie alvo.

Após os procedimentos operatórios, aliviar esse processo de forma eficaz acelera o retorno à homeostasia, logo é necessária a administração de analgésicos mesmo em pequenos roedores. A escolha desse medicamento deve basear-se no possível grau de dor induzida pelo procedimento experimental, uma vez que o uso de drogas analgésicas potentes sem critérios pode levar a efeitos secundários, que não justificariam qualquer vantagem obtida pelo alívio da dor, do mesmo modo, fármacos de baixa potência analgésicas dariam lugar a um alívio insuficiente.

AVALIAÇÃO DA DOR EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Apesar dos mecanismos pressupostos de nocicepção e dor serem semelhantes em todos os mamíferos, detectar a dor pode ser especialmente difícil em roedores. Assim, frente à impossibilidade do relato verbal, a avaliação da dor nos animais é realizada indiretamente, observando suas atitudes e respostas fisiológicas. Contudo, o manejo da dor requer o conhecimento do comportamento de cada espécie em condições normais, sabendo que a resposta à dor varia não só entre as espécies animais, mas também entre indivíduos da mesma espécie.

Uma das principais formas utilizadas como indicativo da dor é a análise da qualidade de vida dos animais e de suas funções biológicas, como por exemplo, seu nível de atividade, postura, ingestão hídrica e alimentar, marcha e interação social. Outra forma, é por meio de escalas de expressões faciais, conhecidas como *Grimace Scale*, sendo chamada em camundongos de *Mouse Grimace Scale*, e em ratos *Rat Grimace Scale*.

O *Grimace Scale* utiliza quatro unidades de avaliação: o fechamento palpebral; o achatamento da ponte do nariz e das bochechas; a posição das orelhas e a posição das vibrissas. Nesta avaliação é designado um valor de zero, um ou dois para cada um destes parâmetros, o escore 0 significa que existe um alto nível de confiança que não existe mudanças no parâmetro avaliado em relação ao basal; o 1, indica uma alta confiança de que a unidade avaliada mostra uma alteração moderada em relação a basal, e o escore 2 indica uma clara mudança na unidade analisada em relação a basal.

Após o avaliador atribuir os escores para cada uma das unidades avaliadas, é feita uma média e o valor resultante será utilizado como um indicativo da presença de dor. Desta forma, os valores abaixo de um representam a presença de dor leve, e os valores entre um e dois, a presença da dor moderada à severa (Figura 1).

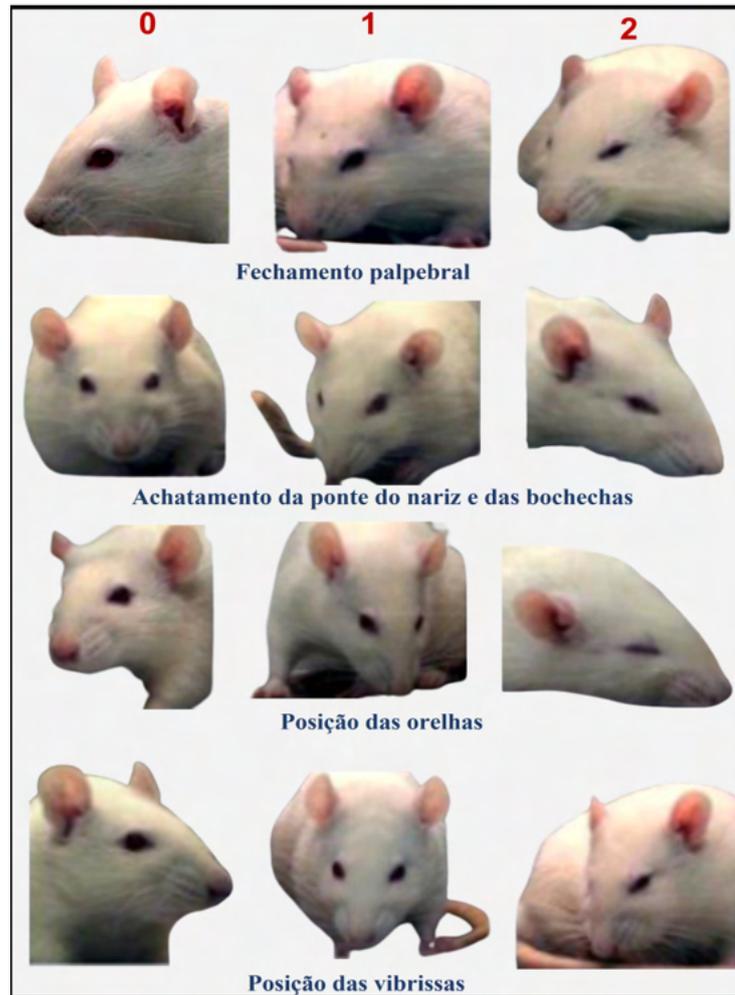


Figura 01: EscORES para avaliação da dor nos ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*). 0: ausência de dor; 1: dor moderada; 2: dor severa.

Fonte: Próprio autor.

Contudo, se a presença de dor não puder ser reconhecida e nem sua intensidade avaliada, então os analgésicos não podem ser usados de forma eficaz. Da mesma forma, se a dor não for detectada, considera-se que não há a necessidade da administração destes. Assim, se um analgésico for administrado, a diminuição da dor deve ser avaliada para estabelecer se a dose utilizada foi eficiente naquele animal. Embora não seja um comportamento fácil de analisar, é importante superar essas dificuldades para que ela possa ser prevenida ou controlada de forma ágil nesses animais.

ANALGESIA EM ROEDORES

Tanto na medicina humana quanto na veterinária, há o reconhecimento da importância de controlar e tratar adequadamente a dor tanto por razões éticas, como para evitar alterações fisiopatológicas causadas por ela e que possam influenciar os resultados do experimento. Deste modo, é obrigação do pesquisador eliminar todo e qualquer sofrimento com auxílio da técnica anestésica e da analgesia bem conduzida, e isto, é tão importante quanto à obtenção dos resultados da pesquisa.

Analgésicos são medicamentos que diminuem ou interrompem as vias de transmissão nervosas, reduzindo a percepção de dor. Contudo, a analgesia é o ato de abolir a sensibilidade a dor com integridade de consciência, sem suprimir outras propriedades sensitivas. Eles podem ser usados como sedativos conjuntamente com os

agentes anestésicos, ajudando na recuperação da condição dolorosa e acelerando o regresso à função normal do organismo. A sua administração varia conforme a condição dolorosa, podendo ser utilizado quando um processo doloroso é efetuado, semanas antes a uma cirurgia, durante a pré-anestesia, no período pós-cirúrgico ou, caso seja necessário, em todo o período operatório.

Em animais de laboratório, vários agentes farmacológicos estão disponíveis para controlar a dor. Esses agentes têm diferentes mecanismos e tempos de duração de ação, bem como potências variadas. Isso permite que o veterinário adeque o tratamento baseado no grau de invasividade de um determinado procedimento e na sua capacidade de provocar dor. A dose dos analgésicos é baseada no peso corporal dos roedores e tende a ser relativamente alta em comparação com outros mamíferos, e isso é devido ao seu pequeno tamanho corporal e à alta taxa metabólica.

A maioria dos analgésicos utilizados em roedores se enquadra na classe dos opioides e dos anti-inflamatórios não esteroidais que garantem boa analgesia somática e visceral. Sendo aquele mais empregado para maior controle da dor pós-traumática ou pós-cirúrgica e este, quando a dor é considerada moderada. Os agentes comumente usados incluem a buprenorfina, tramadol, meloxicam, carprofeno, cetroprofeno, ibuprofeno, acetaminofeno (Tabelas 1 e 2).

Fármaco	Dose/via de administração em rato	Dose/via de administração em camundongo	Intervalo de administração
Buprenorfina *	0,001-0,005 mg/kg SC/ IV 0,1-0,25 mg/kg VO	0,05-0,1 mg/kg SC	8 a 12 horas de analgesia
Butorfanol	1-2 mg/kg SC	1-2 mg/kg SC	4/4 horas
Codeína	20 mg/kg SC	50 mg/kg SC	4/4 horas
Fentanil	0,16 mg/kg SC	0,0125-1 mg/kg IP	Utilização transoperatória. Em ratos produz até 2 horas de analgesia pós-operatória.
Morfina	2,5 -10 mg/kg SC	2,5-10 mg/kg SC	Até 3 a 4 horas de analgesia
Meperidina	10-20 mg/kg SC/IM	10-20 mg/kg SC/ IM	Até 3 horas de analgesia
Metadona	0,5-3 mg/kg SC	-----	Intervalo não estabelecido. Replicar conforme a necessidade do animal.
Oximorfina	0,2-0,35mg/kg SC	0,15 mg/kg SC	6 a 12 horas de analgesia
Tramadol	5-12,5mg/kg SC IP	12,5 mg/kg SC/IP	8-8 horas

Tabela 01: Principais anti-inflamatórios utilizados em ratos e camundongos

Fonte: FLECKNELL (2009).¹

Fármaco	Dose/via de administração em rato	Dose/via de administração em camundongo	Intervalo de administração
Aspirina	100mg/kg VO	120 mg/kg VO	4/4 horas, não alivia dor visceral ou aguda
Cetoprofeno	5 mg/kg VO/ SC	5 mg/kg VO/ SC	12-24 horas de analgesia. Período máximo de uso 3 dias consecutivos.

¹ FLECKNELL, P. Laboratory Animal Anesthesia. 3. ed. 2009. Observação: SC- subcutânea, IP-intraperitoneal, IM-intramuscular, IV-intravenoso.
*Não disponível no Brasil.

Carprofeno (Rymadil®)	5 mg/kg SC	5 mg/kg SC	24 horas de analgesia. Indicação dor aguda. Período máximo de uso 3 dias consecutivos
Dipirona	500-600 mg/kg SC/IV/IP	-----	12/12 horas
Flunixin meglumine (banamine®)	2,5 mg/kg SC	2,5 mg/kg SC	12-12 horas ou 24-24 horas
Ibuprofeno	30 mg/kg VO	40 mg/kg VO	24-24 horas
Meloxicam (maxicam 0,2%)	1 mg/kg VO/SC	5 mg/kg VO/ SC	24-24 horas. Período máximo de uso 3 dias consecutivos
Paracetamol (tylenol®)	100-300 mg/kg VO	100-300 mg/kg VO	4-4 horas

Tabela 02: Principais opioides utilizados em ratos e camundongos

Fonte: FLECKNELL (2009)².

ANALGESIA MULTIMODAL

O conceito de analgesia multimodal preconiza que a combinação de analgésicos com diferentes modos ou locais de ação, melhora a analgesia, reduzem a utilização dos opioides e, portanto, diminuem seus efeitos adversos (náuseas, vômitos e constipação). A analgesia é estabelecida como o melhor meio de controle da dor para procedimentos invasivos em animais de laboratório. Contudo, a incorporação desse procedimento requer a avaliação dos seus efeitos no resultado da pesquisa.

Este conceito está equiparado em modelos de ciências básicas que combinam, por exemplo, analgésicos de ação periférica com os de ação central, ou um opioide e um anti-inflamatório não esteroidal. A principal vantagem sobre a monoterapia é a maximização do efeito analgésico e minimização dos efeitos colaterais, já que quantidades reduzidas de cada droga são necessárias. Além disso, a diminuição no tempo na recuperação pós-cirúrgica.

ANESTESIA EM ROEDORES

A anestesia fundamenta-se na perda parcial ou total dos reflexos sensoriais e motores. Nos anestésicos, a dose e a duração do efeito esperado variam conforme a linhagem dos roedores, a via de administração, a idade, o sexo, o peso, o temperamento, a associação entre os fármacos, as características de cada substância empregada e o estado de saúde dos animais. Além disso, os pesquisadores devem estar aptos para verificar o plano anestésico de cada animal para evitar sub ou sobredosagem anestésica. Ademais, recomenda-se priorizar os anestésicos que apresentem efeitos consolidados, reprodutíveis e que promovam boa margem de segurança tanto para o animal quanto para o operador.

É sabido que a anestesia em animais de laboratório é especialmente difícil devido aos fatores que estão relacionados ao seu pequeno tamanho corporal (pouco tecido subcutâneo) predispondo à hipotermia, sua alta taxa metabólica e a ausência de sinais clínicos confiáveis das funções respiratórias e cardiovasculares. Assim, a anestesia deve interferir o mínimo com o experimento e não deve alterar os resultados que estiverem sendo registrados. Contudo, havendo alteração, esta deve ser analisada.

MEDICAÇÕES PRÉ-ANESTÉSICAS

A organização geral de um protocolo anestésico fundamenta-se nos recursos disponíveis, no treinamento da equipe envolvida, no acompanhamento constante dos animais durante todo o procedimento e, especialmente,

² FLECKNELL, P. Laboratory Animal Anesthesia. 3. ed. 2009. Observação: SC- subcutânea, IP-intraperitoneal, IM-intramuscular, IV-intravenoso. *Não disponível no Brasil.

na condição de saúde deles. O processo anestésico deve iniciar com a administração de um sedativo ou tranquilizante ao animal como Medicação Pré-Anestésica (MPA) e a permanência destes em seu ambiente até que o medicamento faça efeito.

Em roedores, não é necessário jejum prévio à anestesia, pois esses animais não vomitam, além disso, eles se tornam hipoglicêmicos muito rapidamente quando estão em jejum. Este só se torna necessário na ocorrência de uma cirurgia gastrointestinal superior, mas o estômago só ficará completamente vazio se a coprofagia for evitada.

A medicação pré-anestésica, apesar de amplamente utilizada em outras espécies, em pequenos roedores é pouco habitual. Ela consiste na administração de um anticolinérgico, bloqueadores adrenérgicos, tranquilizantes, hipnóticos, neuroleptoanalgésicos ou analgésicos narcóticos antes da indução anestésica e tem os seguintes objetivos: facilitar o manuseio do animal, propiciar indução e recuperação anestésica de forma suave, abolir os reflexos de excitação e luta, reduzir a dose do anestésico geral e proporcionar analgesia no transoperatório.

Após a administração da MPA, é necessário que o animal seja mantido em um local silencioso, calmo, com baixa luminosidade, temperatura controlada e mínima circulação de pessoas. Visto que, ruídos, movimentações e odores retardam os efeitos da MPA. Devido a isso, o animal deve ser mantido preferencialmente sozinho, aquecido e em gaiola limpa com pouca quantidade de maravalha. Os principais MPAs para ratos e camundongos são descritos na tabela 03.

Fármaco	Rato	Camundongo
Acepromazina	2,5 mg/kg IP/IM	2,5 mg/kg IP/IM
Atropina	0,05 mg/kg IP/SC	0,04 mg/kg IP/SC
Cetamina	50-100 mg/kg IP	90-120 mg/kg IP
Diazepam	2,5-5 mg/kg IP	2,5-5 mg/kg IP
Midazolam	5 mg/kg IP	5 mg/kg IP
Medetomidina	30-100 µg/kg IP/SC	30-100 µg/kg IP/SC
Xilazina	1-5 mg/kg IP/IM	5-10 mg/kg IP/IM

Tabela 3 – Doses de medicação pré-anestésica para ratos e camundongos

Fonte: FLECKNELL (2009).³

ANESTESIA GERAL

A anestesia geral é um estado de depressão geral do sistema nervoso central que envolve hipnose, analgesia, supressão da atividade reflexa e relaxamento dos músculos voluntários. Ela pode ser realizada através da utilização de agentes injetáveis, inalatórios ou com a associação dos dois.

Para analisar a profundidade anestésica, deve ser feita a avaliação da presença ou ausência de determinados sinais, como reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e as mudanças na frequência cardíaca e respiratória que sofrem modificações de acordo com o plano anestésico atingido. Se ocorrer a presença de reflexo, a anestesia não está no plano anestésico adequado para a intervenção cirúrgica. Ademais, independente

³ FLECKNELL, P. Laboratory Animal Anesthesia. 3. ed. 2009. Observação: SC- subcutânea, IP-intraperitoneal, IM-intramuscular, IV-intravenoso. *Não disponível no Brasil.

da droga utilizada, esta afetará a fisiologia do animal de alguma maneira. Por isso, para uma anestesia bem equilibrada, as drogas devem ser administradas em uma combinação com a pré-medicação, os analgésicos e os anestésicos para assim, se obter uma melhor estabilidade fisiológica, reduzindo os efeitos colaterais nos animais.

ANESTÉSICOS INJETÁVEIS

Os anestésicos injetáveis são aqueles administrados por via endovenosa, intramuscular (IM), subcutânea (SC) ou pela via intraperitoneal (IP). A escolha da via de administração deve ser baseada nas características químicas dos compostos. Nos roedores, devido ao tamanho ou a difícil contenção de alguns animais, faz com que a via mais utilizada seja a intraperitoneal. A via SC é imprevisível para indução anestésica, devido a sua taxa de absorção lenta e variável, a via IM pode ser difícil em roedores, em consequência da pequena massa muscular disponível no local da injeção.

As vantagens desse tipo de anestesia são a acessibilidade à cabeça e pescoço durante a anestesia, a inexistência de contaminação ambiental e a não necessidade do uso de equipamentos caros. As desvantagens incluem dificuldade e dor durante a aplicação, necessidade de doses mais altas da droga, resposta variável para cada indivíduo, impossibilidade de alterar a profundidade anestésica rapidamente e a exigência de pesar cada animal. Além disso, podem causar longa recuperação, acentuadas alterações cardíacas e respiratórias e deslocamento da injeção em direção aos órgãos abdominais quando administrados por via intraperitoneal.

Os grupos mais utilizados para a anestesia injetável são os barbitúricos: pentobarbital, tiopental; os não barbitúricos: propofol; os dissociativos: cetamina e tiletamina; os sedativos hipnóticos agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos: xilazina, detomidina e medetomidina. A seguir, estão expostas algumas características dos principais fármacos utilizados nessa técnica:

Pentobarbital: é um anestésico que atua principalmente no sistema nervoso central (SNC), ligando-se aos receptores do subtipo A do Ácido Gama Aminobutírico (GABA), este, sendo o responsável por ocasionar e intensificar a depressão no SNC pelo aumento do tempo de abertura dos canais de cloreto. Posto isso, é utilizado na medicina veterinária para eutanásia e anestesia. Em pequenas dosagens é indicado, como sedativo, de curto prazo e como pré-anestésico em cirurgias, em sobredosagens é empregado como anticonvulsivante e indutor de coma. A administração de pentobarbital sódico é um dos poucos métodos de eutanásia listados como aceitáveis em laboratórios de roedores. As principais vantagens como agente de eutanásia é sua confiabilidade para induzir rápida inconsciência, seguido por depressão medular, cardíaca e respiratória e morte subsequente.

Tiopental: é um barbitúrico hipnótico, que produz anestesia geral de ultracurta duração. Possui efeito rápido, mas metabolização lenta, sendo que doses sucessivas levam ao efeito cumulativo. É altamente solúvel em lipídios e rapidamente captado por todos os tecidos, sofre biotransformação no fígado e seus metabólitos são excretados pela urina. Ele permite a obtenção de bons planos anestésicos, que variam de acordo com a dose aplicada.

Etomidato e medetomidato: são hipnóticos de curta ação utilizados para induzir e manter a anestesia geral, como não possuem ação analgésica devem ser associados com um analgésico como por exemplo, os opioides ou $\alpha 2$ agonista. O etomidato é recomendado para animais com cardiopatias. O medetomidato em combinação com o fentanil administrado pela via subcutânea é uma mistura anestésica efetiva em pequenos roedores.

Cetamina e tiletamina: são anestésicos dissociativos, termo usado para descrever a dissociação funcional entre o córtex e o sistema nervoso periférico. Possuem ação analgésica somática (pele e músculo). Apresentam como grande vantagem a versatilidade de ser utilizada por diferentes vias de administração. Usada sozinha em pequenos mamíferos, produz imobilização de curto prazo com pouco relaxamento muscular. Normalmente, são necessárias grandes doses para produzir imobilidade prolongada e anestesia cirúrgica. Quando combinada com a xilazina ou com a medetomidina, normalmente produz, uma anestesia cirúrgica mais eficaz que quando

misturada com outros agentes.

Xilazina e medetomidina ($\alpha 2$ agonista): são potentes analgésicos que devem ser usados em cirurgias mais dolorosas. Associados aos opioides conferem uma ótima analgesia para o animal. A xilazina é a menos eficaz e a medetomidina é a mais eficaz e seletiva para o receptor $\alpha 2$ adrenérgico. Aquele associado com a cetamina melhora o relaxamento muscular, a analgesia e a duração do efeito.

Propofol: é um anestésico único, de curta e rápida duração, não acumulativo e administrado intravenosamente. É utilizado na indução ou na manutenção anestésica. Como não possuem ação analgésica devem ser associados com um analgésico, como por exemplo, os opioides ou $\alpha 2$ agonista. O propofol é indicado em animais com problemas de metabolização (ex: hepatopatias).

ANESTESIA INALATÓRIA

Em relação à via injetável, apresenta a vantagem de mínimo metabolismo hepático e renal e um despertar rápido e tranquilo. No entanto, há a desvantagem da necessidade de equipamentos específicos, um constante monitoramento do plano anestésico, exaustão adequada da sala de anestesia e de uma equipe habilitada. Os anestésicos mais utilizados, nesta técnica, são os líquidos voláteis como o halotano, o isoflurano, enflurano, desflurano e sevoflurano, além de um único gás, o óxido nítrico.

Em todos os roedores, é possível fazer a indução anestésica através de uma câmara ou de uma máscara. O uso de câmaras de indução para pequenos animais tem vantagens e desvantagens. A contenção antes da anestesia é mínima, reduzindo o estresse do animal.

Contudo, uma boa parte dos agentes voláteis são irritantes para as vias aéreas em algum grau, e algumas espécies podem sustentar a respiração, portanto é aconselhável oferecer oxigênio ao animal antes de colocá-lo sob o gás anestésico.

Os anestésicos modernos requerem ainda equipamentos como vaporizadores de precisão, mediadores de vazão e sistema de limpeza eficiente para evitar a poluição do ambiente. Os vaporizadores de precisão e equipamentos de monitoramento (oxímetro de pulso, para determinar a saturação do nível de oxigenação no sangue arterial) aumentam a segurança no uso dos anestésicos em roedores e em outras espécies de animais. No entanto, os agentes inalantes podem promover depressão respiratória, depressão do miocárdio, vasodilatação e hipotensão. Além disso, esse tipo de anestesia exibe fraca analgesia.

A seguir são expostas as características dos principais fármacos utilizados nessa técnica: *Isoflurano* ($CF_2H-O-CHCl-CF_3$): é o anestésico mais usado atualmente, no caso dos roedores, sendo utilizado em procedimentos, simples, rápidos e menos invasivos. Apesar do seu mecanismo de ação ser pouco compreendido, é sabido que este anestésico potencializa as ações do Ácido Gama Aminobutírico (GABA). Ele está associado a uma rápida indução, recuperação e controle da profundidade anestésica, além disso, produz uma depressão cardiopulmonar dependente da concentração e não sensibiliza o miocárdio para as catecolaminas que induzem arritmias. Ele confere ação neuroprotetora à isquemia e hipóxia, no entanto, há estudos que mostram que uma exposição longa a este medicamento pode provocar degeneração neuronal na sequência de um quadro de hipoglicemia e acidose metabólica. A depressão respiratória é um pouco maior com o isoflurano do que com o halotano, e parece haver uma diferença de magnitude na depressão cardiopulmonar entre as espécies.

Sevoflurano ($CFH_2-O-CH[CF_3]_2$): é um éter metil isopropílico altamente fluorado, de cheiro adocicado não inflamável frequentemente usado como agente anestésico inalatório apresenta baixa solubilidade sanguínea (indução e despertar rápido) comparando com o isoflurano ou halotano, o que permite que o nível de sevoflurano no cérebro aumente mais rapidamente durante a indução anestésica. Ademais, esse anestésico requer um vaporizador específico, não podendo ser usado num vaporizador de halotano ou de isoflurano porque tem uma pressão de vapor diferente. O sevoflurano tem metade da eficácia do isoflurano, mas, atualmente, custa o dobro por mililitro. Sua biotransformação, catalisada principalmente pelo citocromo P450 2E1, é predominantemente hepática e pequena (2% a 5%), com a produção de flúor inorgânico e do flúor orgânico: hexafluoroisopropanol.

Entretanto, o flúor inorgânico é capaz de produzir peroxidação lipídica em diversos tecidos como fígado, encéfalo e intestino de ratos.

Halotano: é um líquido não inflamável, muito potente, com alto índice terapêutico, sendo largamente empregado. Além disso, não é irritante para as membranas, sendo o mais barato. Podem ser notados tremores durante a recuperação, e isso se deve ao seu efeito depressor cardíaco que reduz a pressão sanguínea, sensibilizando o coração para os efeitos arrítmicos das catecolaminas. Entre os halogenados é o que possui maior taxa de metabolização hepática (20% na espécie humana), no sistema enzimático do citocromo P-450, tendo como produtos de sua metabolização o ácido trifluoroacético, bromo e íons cloreto.

RECOMENDAÇÕES E CUIDADOS NO PÓS-OPERATÓRIO DE ROEDORES

Conforme a *Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividade de Ensino ou Pesquisa Científica* (DBCA, 2016), o período pós-operatório deve obrigatoriamente proporcionar conforto e analgesia para o animal sempre que a dor não for o propósito do protocolo experimental. Deve-se ter precaução com a hidratação, alimentação, higiene, temperatura e controle das infecções. Caso o animal demonstre sinais clínicos compatíveis com dor intensa e resistência aos tratamentos analgésicos, ele deverá ser submetido à eutanásia.

A recuperação dos animais deve ser feita em sala ou cama aquecida, sem ruídos e com baixa luminosidade. A temperatura deve estar em torno de 25°C para evitar hipotermia. A dor no pós-operatório deve ser pesquisada metodicamente para determinar se o animal necessita da administração de analgésico e isso, envolve vários indicadores como: avaliação da atividade motora, alteração da aparência, como postura encurvada, piloereção, secreção ocular ou nasal; alteração no temperamento, aumento da agressividade, relutância em interagir, batimento ou rangido dos dentes, aumento ou diminuição da vocalização; alterações no consumo de alimentos ou água, perda de peso, diminuição da excreção de urina e fezes; alterações fisiológicas, nos batimentos cardíacos, taxas respiratória, pressão sanguínea, saturação de oxigênio, cor da pele. No local da cirurgia, observar a presença de eritema, edema etc. Por fim, para as cirurgias em que não houver recuperação, o animal deve permanecer anestesiado até a eutanásia.

ALTERAÇÕES NOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DECORRENTES DO USO DOS ANALGÉSICOS E ANESTÉSICOS EM ROEDORES

As alterações orgânicas causadas pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) dependem da sua ação seletiva sobre as cicloxigenases I e II. Como estas enzimas estão presentes no trato gastrointestinal e nos rins, todos os AINES podem provocar, em maior ou menor grau lesões nesses órgãos.

Em animais, podem ocasionar desde gastrite moderada e vômito, até graves ulcerações, sangramento e possivelmente, morte. Essas sequelas estão relacionadas tanto a uma irritação local, como ao bloqueio da COX e também pela sua interferência na produção de prostaglandinas, a qual é crucial na manutenção da mucosa gástrica. Em anexo, encontra-se a classificação dos anti-inflamatórios não esteroides, segundo sua seletividade para a ciclo-oxigenase (Tabela 4).

Seletividade para a ciclo-oxigenase	
Não seletivos (cox 1 e 2)	Seletivos cox 2 (coxibes)
Tradicionais convencionais	
Aspirina	Rofecoxibe (vioxx)
Acetaminofeno	Valdecoxibe (bestra)
Indometacina (indocid)	Parecoxibe

Ibuprofeno (Moltrin,Dalsy)	Celecoxibe (celebra)
Naproxeno (naprosin)	Etoricoxibe (arcoxia)
Sulindac (clinoril)	Lumiracoxibe (prexige)
Diclofenaco(voltaren)	
Piroxicam (feldene)	
β- piroxicam (cicladol)	
Meloxicam (movatec)	
Cetoprofeno (profenid)	

Fonte: BATLOUNI, 2010.

Tabela 4 – Classificação dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) segundo sua seletividade para ciclo-oxigenase.

Fonte: BATLOUNI, 2010.

Em relação ao uso de opioides em roedores, estudos mostraram que eles diminuem a atividade das células do sistema imune como, por exemplo, a dos macrófagos e das células Natural Killer (ACLNK). Outros autores sugerem que os animais ficam mais susceptíveis a alguns tipos de infecções, até mesmo a disseminação metastática de doenças neoplásicas.

Estudos também relataram que em roedores, os opioides são mais potentes ou têm maior eficácia em machos que em fêmeas. A analgesia após o uso de morfina, por via sistêmica, mostrou-se menor em fêmeas ovariectomizadas que receberam reposição hormonal e, em machos, a castração diminuiu a resposta analgésica para o receptor μ (mu ou mi), enquanto que a reposição com testosterona aumentou a analgesia.

As variações cíclicas dos hormônios gonadais em fêmeas são um dos fatores responsáveis pelas diferenças sexuais à analgesia por opioides. Diferenças nas respostas analgésicas seguidas à administração ventricular de morfina são significativas em determinadas fases do ciclo das fêmeas, com grande sensibilidade ao opioides durante a fase de proestro, fase de maior nível plasmático de estrógeno, e menor durante a fase de estro, fase de menor nível plasmático do estrógeno.

Os anestésicos, de modo geral, deprimem o sistema cardiorrespiratório e mecanismo de termorregulação dose dependente, devido a isso, é importante que seja administrada somente a dose mínima para promover adequado plano anestésico. O horário de administração também pode influenciar na absorção do fármaco em decorrência do ciclo circadiano. Maiores períodos de sedação e anestesia foram observados quando os fármacos foram administrados no início da fase escura, o que pode ser explicado pela menor quantidade de alimento ingerida.

Cetamina: Uma das associações mais utilizadas em roedores é a combinação de cetamina e xilazina. Segundo o Comitê de Especialistas em drogas da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2015), a cetamina é um anestésico e analgésico que continua a ser importante em escala global, e isso se deve ao seu perfil de segurança e baixo custo. De acordo com essa mesma organização, as potenciais reações adversas pelo seu uso foram ansiedade, agitação, mudanças perceptivas e deficiência na função motora, além disso, pesquisas também mostraram hipertensão e efeitos psicomiméticos. Além disso, quando associado à xilazina, causa depressão respiratória e hipóxia. Essa junção causa hiperglicemia, aumento de frequência respiratória e diminuição dose-dependente na pressão sanguínea e no débito cardíaco, sugerindo forte influência cardíaca. Não foram encontrados registros dos efeitos dos anestésicos e suas combinações, especialmente em parâmetros bioquímicos em hamsters, contudo, pode ser que sejam afetados de maneira semelhante a outras espécies de

roedores. Não são indicados para procedimentos intratorácicos e intra-abdominais. Além disso, esse anestésico faz com que os olhos permaneçam abertos, sendo fundamental a aplicação de gotas oculares protetoras em gel, ou soro fisiológico, imediatamente após a sedação profunda ou à indução anestésica.

Pentobarbital: pesquisas sugerem que o pentobarbital sódico é doloroso para os ratos, quando administrados por via intraperitoneal e que esta dor pode ser amenizada, incluindo um anestésico local como solução, além disso, a recuperação é prolongada e pode estar associada à excitação involuntária.

Tiopental: doses sucessivas ocasiona efeito acumulativo, além disso, o tiopental deprime o sistema cardiovascular e a respiração, causando queda da pressão e queda da temperatura, devido à depressão do metabolismo basal.

Etomidato: foi observado a supressão da função adrenocortical após infusão prolongada.

Xilazina e medetomidina ($\alpha 2$ agonista): Esses fármacos provocam depressão respiratória, hipertensão ou hipotensão. Além disso, a bradicardia, causada pelo efeito vagal central e periférico como resposta a hipertensão ou ambas.

Propofol: Produz apneia e depressão cardiopulmonar dependente da dose. Além disso, hipotensão decorrente da combinação da dilatação arterial e venosa, juntamente com a diminuição da contratilidade do miocárdio.

Sevoflurano: Estudos sugerem que a exposição repetida ao sevoflurano, independentemente da concentração, reduz o volume do hipocampo, o número de neurônios e o comprimento dos dendritos em ratos neonatos. Ademais, todas essas reduções foram um pouco mais acentuadas quanto maior a concentração usada de sevoflurano. A biotransformação hepática produz flúor inorgânico e hexafluorisopropanol, que tem potencial nefrotóxico e hepatotóxico.

Halotano: Apresenta muitas características indesejáveis, como o aumento da sensibilização do miocárdio às catecolaminas, o que favorece a ocorrência de arritmias graves. Além disso, ocasionalmente pode levar à hepatite e insuficiência hepática.

Isoflurano: Estudos mostram que uma longa exposição a esse medicamento pode produzir degeneração neuronal na sequência de um quadro de hipoglicemia e acidose metabólica. Além disso, estudos com chinchilas mostraram que o isoflurano causa hipotermia, sendo por isso essencial o aquecimento dos roedores, independente do protocolo anestésico utilizado.

REFERÊNCIAS

Abou Khaled, K. J.; Hirsch, L. J. Updates in the management of seizures and status epilepticus in critically ill patients. **Neurologic Clinics**, v. 26, p. 385-408, 2008.

Allweiler, S. I. How to Improve Anesthesia and Analgesia in Small Mammals. **Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice**, v. 19, n. 2, p. 361-377, 2016.

Almeida, I. B.; Neto J. J. S. B.; Oliveira, T. K. B. **Princípios básicos de pesquisa com animais de laboratório**. 1.ed. Aracaju: Edifs, 2016. 54 p.

Andrade, A.; Pinto, S. C.; Oliveira, R. S. Animais de Laboratório: criação e experimentação. 2002. Disponível em: <https://repositorio.ifs.edu.br> Acesso em: ago. 2016. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6.

Andrade, A.; Pinto, S. C.; Oliveira, R. S. (Org.). *Animais de Laboratório: criação e experimentação [on-line]*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Disponível em: [from SciELO Books <http://books.scielo.org>](http://books.scielo.org).

Ekaterina Akimovna B. Rivera Anestesia em Animais de Experimentação. ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books

Araújo, S. A. C.. Anestesia em roedores. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, 2010.

- Artemiadis, A. K.; Zis, P. Neuropathic pain in acute and subacute neuropathies: A systematic review. **Pain Physician**, v. 21, n. 2, p. 111-120, 2018.
- Azari, P. *et al.* Efficacy and safety of ketamine in patients with complex regional pain syndrome: A systematic review. **CNS Drugs**, v. 26, n. 3, p. 215-228, 2012.
- Batlouni, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. **Arquivo da Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.
- Bell A, Review The neurobiology of acute pain. **The Veterinary Journal** v. 237, p. 55-62, 2018.
- Bernal, S. A. *et al.* PAG mu opioid receptor activation underlies sex differences in morphine antinociception. **Behavioural Brain Research journal**, v. 177, n. 1, p.126-33, 2007.
- Berne, R. M.; Levy, M. N. **Fisiologia**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- Carvalho, F. A.; Ota, C. C.C. Aspectos Fisiológicos e Culturais da Dor. **Anais do XI EVINCI**. Centro Universitário Autônomo do Brasil-UniBrasil, 2016. ISSN:2525-5126.
- Cevasco, M.; Ashley, S.; Cooper, Z. Chapter 44. Physiologic response to surgery. p 291–295. In: McKean SC, Ross JJ, Dressler DD, Brotman DJ, Ginsberg JS (Ed.). **Principles and practice of hospital medicine**. New York (NY): The McGraw-Hill Companies, 2012.
- Clark, D. W. *et al.* Do some inhibitors of COX II increase the risk of thromboembolic events? Linking pharmacology with pharmacoepidemiology. **Drug Saf**, v. 27, p. 426-456, 2004.
- Clifford, C. B.; Simmons, J. H. The laboratory hamster. In: KURTZ, D. M.; TRAVLOS, G. S. (Ed.). **The clinical chemistry of laboratory animals**. 3rd. Ed. [S.l.]: CRC Press, 2018. p. 289-304.
- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Resolução Normativa** nº 33, de 18 de novembro de 2016.
- Cortright, D. N. *et al.* New frontiers in assessing pain and analgesia in laboratory animals. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 1099-1108, 2008.
- Craft, R. M. Sex differences in opioid analgesia: from mouse to man. **The Clinical Journal of Pain**, v. 19, n. 3, p. 175-186, 2003.
- Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividade de Ensino ou Pesquisa Científica-DBCA. Disponível em: http://www.met.gov.br/upd_blob/0238/238684.pdf 2016.
- Donnelly T. Introduction to small mammals. In: O' Malley B. (Ed.), **Clinical Anatomy and Physiology of exotic species: Structure and function of mammals, birds, reptiles and amphibians**, Saunders, 2005. p. 165-171.
- Esper, T. *et al.* Blood/gas partition coefficients for isoflurane, sevoflurane, and desflurane in a clinically relevant patient population. **Anesthesia & Analgesia**, v. 120, p. 45-50, 2015.
- Farver, T. B. *et al.* Assessment of isoflurane-induced anesthesia in ferrets and rats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 12, p. 1577-1583, 1999.
- Fish, E. R. *et al.* **Anesthesia and Analgesia for Laboratory Animals**. 2nd ed. Elsevier: Oxford, 2008.
- Flecknell, P. Anestesia de roedores y conejos. In: Hollingshead, K. W.; Mckelvey, D. (Ed.). **Manual de Anestesia y Analgesia Veterinária**. 3. Ed., Mosby, 2003. P. 361-396.
- Flecknell, P. A. Laboratory animal anaesthesia. London (United Kingdom): Academic Press, 2016.
- Flecknell, P. A. Anaesthesia and analgesia for rodents and rabbits. In: Laber-Laird K, Swindle, M. M.; Flecknell, P. A. **Handbook of Rodent and Rabbit Medicine**. Pergammon Press, Butterworth- Heineman, Newton, MA. 1996, p. 219-37.
- Flecknell, P. Analgesics in Small Mammals. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 21, p. 83-103, 2018.

- Foley, P. L. *et al.* Clinical Management of Pain in Rodents, **Comparative Medicine**, v. 69, n. 6, p. 468489, 2019.
- Fox, L. *et al.* Comparison of Dexmedetomidine-Ketamine with Isoflurane for Anesthesia of Chinchillas (*Chinchilla lanigera*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 55, p. 312-316, 2016.
- Fueger, B. J. *et al.* Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice, **Journal of Nuclear Medicine**, v.47, p. 999-1006, 2006.
- Gargiulo, S. *et al.* Mice Anesthesia, Analgesia, and Care, Part I: Anesthetic Considerations in Preclinical Research. **ILAR Journal**, v. 53, n. 1, p. 55-69, 2012.
- Heard, D. J. Anesthesia, Analgesia, and Sedation of Small Mammals. In: Carpenter, J. W., Quesenberry, K. E. (Ed.), **Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and Surgery**. 2. Ed, Saunders, 2003. P. 356-368.
- Holtkamp, M. *et al.* The management of refractory generalised convulsive and complex partial status epilepticus in three European countries: a survey among epileptologists and critical care neurologists. **Journal of Neurology Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 74, p. 1095-1099, 2003.
- Huss, M. K. *et al.* Influence of Pain and Analgesia on Orthopedic and Wound-healing Models in Rats and Mice. **Comparative Medicine**, v. 69, n. 6, p. 535-545, 2019.
- International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy Classification of Chronic Pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain Suppl.** v. 3: S1-226, 1986.
- Kruse-Elliott. "Anaesthesia". In: Flecknell, P. (Ed.), **Laboratory Animal Anaesthesia**. 3. Ed, Saunders, 2009, 19-78.
- Lamplot, J. D. *et al.* Multimodal pain management in total knee arthroplasty: a prospective randomized controlled trial. **Journal of Arthroplasty**, v. 29, p. 329-334, 2014.
- Lee, Y. M. *et al.* Impact of Volatile Anesthetics on Oxidative Stress and Inflammation. **Biomed Research International**, v. 2015, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/242709>. Acesso em: 25/Jan./22.
- Loepke, A. W. *et al.* The physiologic effects of isoflurane anesthesia in neonatal mice. **Anesthesia & Analgesia**, v. 102, n. 1, p. 75-80, 2006.
- Longley, L. Rodent anaesthesia - **Anesthesia of exotic pets**, Saunders, 2008. p.59-80.
- Manual de Anestesia e Analgesia do Biotério da UNIFAL-MG. Disponível em: <https://www.unifal-mg.edu.br>.
- Massone, F. Anestésias gerais barbitúrica e não barbitúrica. In: **Anestesiologia Veterinária**. 5. ed. Guanabara Koogan (Rio de Janeiro), 56-65, 2008.
- Turk, D.; Melzack, R. The measurement of pain and the assessment of people experiencing pain. In: Turk D, Melzack R (Ed.) **Handbook of pain assessment**. 3rd edn. Guilford Press, New York, 2011, p 542
- Melzack, R.; Wall, P. D. **The challenge of pain**. 2nd edn. Penguin, London, 1996.
- Merrett, K. L.; Jones, R. M. Inhalational anaesthetic agents. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 52, p. 260-263, 1994.
- Miller, A. L.; Leach, M. C. The effect of handling method on the mouse grimace scale in two strains of laboratory mice. **Laboratory Animals**, v. 50, n. 4, 2016.
- Miller, A. L. *et al.* Rodent Analgesia. The **Veterinary Clinics of North America Exotic Animal practice**, v. 14, p. 81-92, 2011.
- National Research Council. **Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório** traduzido por Ekaterina Akimovna Botovchenko Rivera. 8.ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 267, 2014.
- Neves, S. M. P. *et al.* **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério e Experimentação da FCF-IQ/USP**. 1 ed. São Paulo; 2013. p. 216.
- Oliveira, T. K. B. *et al.* Requisitos e normas de um biotério em uma instituição de ensino superior. **Revista Tema**, v. 12, n.17, 2011.

- Pompeu, E. Analgesia e Anestesia. In: Lapchik, V. B. V.; Mattaraia, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. São Paulo: Atheneu Editora, p. 561-574, 2009.
- Remie, R. Anesthesia in Laboratory Animals. In: Andersen, M. L.; Tufik, S. *Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p. 417-427, 2010.
- Rhoden, E. L.; Rhoden, C. R. In: **Princípios e Técnicas em Experimentação Animal**. Porto Alegre: UFRGS Editora, 2006. p. 46-47.
- Rodrigues, B. D. *et al.* **Analgesia e anestesia em modelos experimentais** RESBCAL, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 107-115, 2017. ISSN 2238-1589.
- Sakai, E. M. *et al.* Inhalation anesthesia and volatile liquid anesthetics: focus on isoflurane, desflurane, and sevoflurane. **Pharmacotherapy**, v. 25, p.1773-1788, 2005.
- Shavit, Y. *et al.* Effects of footshock stress and morphine on natural killer lymphocytes in rats: studies of tolerance and crosstolerance. **Brain Research**, v. 372, p. 382-385, 1986.
- Shayiq, R. M. *et al.* Fluoride and lipid peroxidation: a comparative study in different rat tissues. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 37, p.70-76, 1986.
- Sotocina, S. G. *et al.* The Rat Grimace Scale: A Partially Automated Method for Quantifying Pain in the Laboratory Rat via Facial Expressions. **Molecular Pain**, v. 7, n. 55, p. 1744-8069-7, 2011.
- Soubhia, A. F. *et al.* O Efeito dos Anestésicos Inalatórios Halotano e Sevoflurano em um Modelo Experimental de Lesão Hepática. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 16, n. 5, p. 597-603, 2011.
- Stasiak, K. L. *et al.* Species-specific assessment of pain in laboratory animals. **Contemporary topics in laboratory animal science**, v. 42, p. 13-19, 2003.
- Stoffel, E. C. *et al.* Gonadal hormone modulation of mu, kappa, and delta opioid antinociception in male and female rats. **Journal of Pain**, v. 6, n. 4, p. 261-274, 2005.
- Suckow, M. A.; Turner, P. V. Pain as a Clinical Factor and Experimental Variable in Research Rodents, **Comparative Medicine** v. 69, n. 6, 2019.
- Svendsen, O. *et al.* Nociception after intraperitoneal injection of a sodium pentobarbitone formulation with and without lidocaine in rats quantified by expression of neuronal c-fos in the spinal cord-a preliminary study. **Laboratory Animals**, v. 41, p. 197-203, 2007.
- Tanaka, D. M. *et al.* Effect of diferente anesthetic agents on left ventricular systolic function assessed by echocardiography in hamsters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 10, p. 1-7, 2016.
- Thurmon, J. C.; Tranquilli, W. J.; Benson, G. J. Injectable anesthetics. In: Thurmon, J. C.; Tranquilli, W.; Benson, G. J (Ed.). **Veterinary Anesthesia**, 3. ed. Lea & Febiger: Baltimore), 210-240, 1996.
- Tsukamoto, A. *et al.* Vital signs monitoring during injectable and inhalant anesthesia in mice. **Experimental Animals**, v. 64, n. 1, p. 57-64, 2015.
- Turk, D.; Melzack, R (2011) The measurement of pain and the assessment of people experiencing pain. In: Turk, D.; Melzack, R. (Ed.). **Handbook of pain assessment**, 3rd edn. Guilford Press, New York, p 542.
- Turner, P. V. *et al.* Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 50, n. 5, p. 600-613, 2011.
- Walker, S. E.; Iazzetta, J. Compatibility and stability of pentobarbital infusions. **Anesthesiology**, v. 55, p. 487-489, 1981.
- Wickerts, L. *et al.* Coxibs: is there a benefit when compared to traditional non-selective NSAIDs in postoperative pain management? **Minerva Anestesiologica**. v. 77, p. 1084-1098, 2011.
- World Health Organization (WHO). **Expert Committee on Drug Dependence Thirty-seventh meeting**. (2015).
- Young, A.; Buvanendran, A. Recent advances in multimodal analgesia. **Anesthesiology Clinics**, v. 30, p. 91-100, 2012.

CAPÍTULO 7

BIOSSEGURANÇA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Data de aceite: 01/03/2022

Leucio Duarte Vieira

Prof. Dr. Universidade Federal de Pernambuco

INTRODUÇÃO

A experimentação animal envolve diversos procedimentos que geram riscos à saúde. É fundamental que os pesquisadores e a equipe técnica tenham conhecimento sobre onde esses riscos se encontram e a maneira adequada de evitá-los. Dessa forma, deve ser parte da formação daqueles que utilizam animais experimentais, os conhecimentos dos procedimentos de Biossegurança. Esta representa o conjunto de ações destinadas à prevenção, à minimização ou à eliminação de riscos inerentes às atividades que envolvam situações que possam comprometer a saúde do homem, dos animais, do meio ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos.

No Brasil, a Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, instituiu a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), uma instância colegiada multidisciplinar cuja finalidade é prestar apoio técnico consultivo e assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a organismos geneticamente modificados (OGM), bem como no estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGMs e derivados. As ações da CTNBio

são direcionadas sobretudo ao estabelecimento de normas técnicas de segurança da tecnologia do DNA recombinante, principalmente procedimentos que envolvam manipulação de OGMs e derivados. Apesar da legislação nacional apresentar um foco maior na segurança da tecnologia do DNA recombinante, a manutenção da Biossegurança é um fator primordial para a qualidade de um Biotério, independentemente de que nele existam OGMs. Para isso é necessário que as normas adotadas em biotérios de produção e experimentação estejam alinhadas com os critérios preconizados no Brasil e no exterior.

O estudo da Biossegurança é extremamente amplo e abrange desde a condução de boas práticas operacionais, nos mais diversos tipos de estabelecimentos (laboratórios, empresas, hospitais etc.), até o estudo da arquitetura dos edifícios e manejo adequado de resíduos (biológicos, químicos e radioativos). Esse capítulo abordará o tema da Biossegurança, em uma perspectiva das atividades inerentes à manutenção de animais de laboratório, ou seja, os procedimentos preconizados no Biotério.

Os biotérios de experimentação e de produção apresentam riscos específicos que devem ser considerados nas normas de biossegurança. Portanto, é necessária capacitação e treinamento adequado de funcionários e usuários, bem como a adoção de protocolos operacionais rígidos que reduzam esses riscos para as pessoas, animais e ambientes. A classificação do risco biológico considera o indivíduo, a comunidade e o meio ambiente. O símbolo representativo de presença de risco biológico é apresentado na figura 01. De acordo com o possível potencial patogênico (riscos 1 a 4), as práticas e as instalações dos biotérios são classificadas em nível de biossegurança (NB): NB1 (nível 1), baixo risco individual e comunitário. Os agentes não causam

risco ao animal nem ao homem (ex. *Lactobacillus*); NB2 (nível 2), moderado risco individual e limitado para a comunidade; causa doença ao animal ou ao homem (exs. *S. aureus*, Herpes, Rubéola); NB3 (nível 3), alto risco individual e moderado para a comunidade, causa doença grave ao animal e ao homem (ex. *Bacillus anthracis*, HIV); e NB4 (nível 4), elevado risco individual e para a comunidade, possui agentes que causam doenças graves, facilmente transmissíveis (ex. vírus do Ébola) ao animal e ao homem. As instalações para os níveis 3 e 4 são de alta segurança e de segurança máxima, respectivamente. É importante lembrar que os biotérios precisam adotar as Boas Práticas de Laboratório (BPL) e necessitam de um plano de emergência e incêndio.

O biotério NB1 é adequado para a manutenção dos estoques de animais após quarentena e para animais inoculados com agentes do grupo de risco 1. O NB2 deve guardar todos os cuidados do NB1 e deve ser considerado o uso de portas de fechamento automático e edificação que facilite a limpeza e manutenção, com exaustão para o exterior (o ar não pode ser recirculado). O acesso deve ser restrito e o risco biológico deve ser identificado em locais visíveis, como portas. NB3 é recomendado para animais inoculados com agentes do grupo de risco 3. O agente infeccioso pode ser transmissível por aerossóis. O NB4 é de máxima segurança e deve ser construído em área isolada. É necessário o uso de cabines de Biossegurança de classe III e roupas de proteção com pressão de ar positiva, ou seja, roupas com a pressão de ar interna maior do que a do ambiente.



Figura 01 – Símbolo de Risco Biológico desenvolvido por Charles Baldwin em 1966¹

Fonte: Próprio autor.

O BIOTÉRIO

Na experimentação animal, o sítio primário de atenção para a manutenção da biossegurança deve ser o biotério, e sua relação com o meio ambiente e os elementos que o integram: instalações físicas, os animais, o experimentador, os equipamentos, o material de experimentação e os agentes biológicos patogênicos. A resposta biológica de um animal de experimentação a um estímulo é afetada por efeitos genéticos e ambientais.

O biotério é uma construção devidamente projetada para acomodar ambientes estritamente controlados para produção e manutenção de espécies animais que serão utilizadas como reagentes biológicos principalmente em programas de pesquisa. Sendo considerada a premissa de que o animal de laboratório é o principal elemento na pesquisa, a sua manutenção em condições ideais é importante para a confiabilidade e repetitividade dos resultados experimentais. Dessa forma, a organização funcional, espacial e construtiva do biotério deve apresentar-se conforme os padrões de higiene, assepsia e segurança específicos a cada espécie a ser utilizada. A configuração inadequada desses espaços pode levar a alterações comportamentais e funcionais dos animais.

Um biotério é formado por inúmeras salas destinadas à criação, à manutenção, à cirurgia, à quarentena

¹ Indica possível perigo de contaminar ou infectar elementos que entrem em contato.

e a procedimentos diversos. As instalações do biotério são estruturas que tem uma relação com laboratórios de pesquisa, embora sejam distintos. As instalações são complexas e caras para se construir e operar, mas são vitais para o apoio à pesquisa e à preservação da ética e da biossegurança.

Os biotérios podem ser especializados em criação ou experimentação. A localização ideal de um biotério de criação deve ser isolada de ambientes de grande circulação com a finalidade de haver interferência de fatores ambientais. No caso do biotério de experimentação, sua localização deve ser próxima aos laboratórios de pesquisa para que os procedimentos experimentais sejam convenientemente realizados pelos pesquisadores. Em ambos os casos, é importante que os devidos cuidados sejam garantidos na relação dos animais com o meio ambiente, bem como no transporte.

A configuração arquitetônica deverá ser ajustada de acordo com a espécie animal, densidade populacional, tipos de estantes, procedimentos experimentais executados e nível de biossegurança exigido. Esses fatores repercutem em características como: número e tamanho das salas, configuração dos corredores de circulação, rotas de acesso, assim como infraestrutura hidráulica e elétrica.

Os corredores do biotério devem permitir fácil circulação de pessoas e equipamentos, estando configurados para que a circulação seja unidirecional. Em uma estrutura básica, as salas de manutenção estão interligadas por corredores para circulação, sendo, preferencialmente, em número de dois, um de acesso e outro de saída. Na presença de uma área de circulação única, há uma maior possibilidade de contaminação em virtude do encontro de pesquisadores, animais, material limpo e descarte.

Um biotério que apresenta uma estrutura com dois corredores independentes permite um fluxo unidirecional de pessoas, animais e materiais, sendo um corredor para entrada de material e pessoas, e outro para saída. Essa configuração é importante para proteção de ambos, animal e meio ambiente, garantindo menor risco de contaminação cruzada. Essa estrutura pode estar acoplada às salas de desinfecção de materiais e quarentena de animais para proteger a contaminação do meio ambiente para o animal, bem como pode estar acoplada às estruturas especializadas na esterilização de descartes para proteção do meio ambiente. Apesar das vantagens dessa estrutura mais complexa, o biotério terá um maior custo para edificação e demandará uma maior área física.

Os componentes básicos da estrutura de um biotério apresentam características que devem ser seguidas para manter a mínima biossegurança, tanto dos animais e pesquisadores, quanto do meio ambiente. As portas devem ser amplas para permitir adequadamente a circulação dos pesquisadores, equipamentos, insumos e transporte de animais. O vão inferior das portas não deve permitir a fuga ou entrada de animais, e deve apresentar visores amplos que permitam a visualização dos ambientes.

O sistema de ventilação não deve permitir a recirculação do ar, devendo estar presente, mesmo que as estantes dos animais apresentem ventilação própria. O controle de temperatura e umidade estão diretamente associados à regulação do metabolismo e comportamento animal, existindo uma faixa ideal para cada espécie animal. A climatização do ambiente deve se ajustar à unidade de alojamento do animal, ao tipo de cama, à densidade populacional, ao sistema de exaustão de ar, ou qualquer variável que afete o controle de temperatura e umidade da sala. Um sistema inadequado de exaustão de ar pode repercutir tanto com a biossegurança dos pesquisadores, técnicos e animais experimentais como também nos equipamentos do biotério. Por exemplo, um sistema de exaustão excessivo pode levar a uma sobrecarga do funcionamento dos equipamentos de climatização, e prejudicar o controle da temperatura da sala. Por outro lado, uma exaustão deficitária pode levar à retenção de odores que são agressivos para os seres humanos e aos próprios animais. Grande parte desses odores é produzida pela decomposição bacteriana dos excrementos, porém não se deve usar produtos que os mascarem, pois podem ser nocivos aos animais. Deve-se perceber que essa é uma variável que não depende apenas da exaustão, ou seja, também depende de outros fatores, tais como processos de limpeza, características do microambiente e modelo experimental.

O sistema de iluminação deve ter a intensidade ajustável, garantindo intensidade adequada para a execução das atividades de técnicos e pesquisadores, bem como fornecer menor intensidade enquanto não

houverem atividades. Além disso, deve existir controle de fotoperíodo, preferencialmente, com mimetização do amanhecer ou entardecer, ou seja, sem variações bruscas de intensidade. A fotoperiodicidade influencia diversas características dos animais, incluindo ritmos circadianos, ciclos reprodutivos, atividade locomotora, consumo de água e alimentos, temperatura corpórea etc.

O som também deve ser extremamente controlado nos biotérios. Os ruídos podem ser provenientes dos pesquisadores, animais, equipe e processos de manutenção, e equipamentos. A maioria dos animais são capazes de perceber sons de frequências superiores àquelas que são audíveis pelos homens.

Não deve existir fluxo de ar das áreas sujas para áreas limpas, e para isso, a pressão do ar deve sempre ser maior nas áreas limpas ou nas áreas classificadas, nas quais é requerido menor contaminação ou maior assepsia. Por outro lado, a pressão do ar em salas de experimentação deve ser sempre menor que a dos corredores de acesso, para que seja evitada a contaminação ambiental. O movimento de ar em cada sala também depende das correntes de ar que se originam das gaiolas com animais, de outras fontes de calor (equipamentos, lâmpadas e janelas), além do próprio sistema de ventilação.

Os cuidados com o microambiente também são fundamentais para a manutenção da biossegurança do biotério. Sendo o local de manutenção direta do animal, alterações do microambiente podem ter uma grande repercussão na qualidade do experimento e na biossegurança. Nesse ambiente, devem ser considerados os motivos da escolha dos materiais usados na confecção de gaiolas, o projeto da gaiola, a distribuição espacial das gaiolas e o material da cama. Todas essas variáveis devem estar em consonância com os números de animais e protocolo experimental. As correntes convectivas provocadas pelo calor dos animais associadas ao número de animais por gaiola, de gaiola por estante e de gaiolas por sala, são fatores que poderão contribuir para a contaminação cruzada.

Além dos componentes básicos, a presença de salas especiais facilita a manutenção da qualidade das atividades do biotério: área de higienização, desinfecção e esterilização, área de descontaminação, vestiários, quarentena/recepção, sala de procedimento, sala de eutanásia, antecâmara e depósitos.

A construção física de um biotério deve ser ajustada de acordo com sua finalidade, número de animais a serem alojados, alocação de equipamentos de manutenção animal, corpo técnico e biossegurança. Por exemplo, é indicado que os biotérios de experimentação possuam um número maior de salas de dimensões menores para atender os diferentes níveis de biossegurança que possam ser exigidos, enquanto que biotérios de criação devem possuir salas com maior capacidade de alojamento.

RISCOS À BIOSSEGURANÇA EM BIOTÉRIOS

Os procedimentos realizados em pesquisa experimental são permeados de riscos ao experimentador e ao meio ambiente, e dessa forma, as normas de Biossegurança devem sempre ser atentamente seguidas. O trabalho com experimentação animal é uma das possíveis fontes de risco na pesquisa experimental, e a saúde do animal é um aspecto adicional que deve ser observado, por aspectos éticos e pela própria qualidade da experimentação.

Os riscos à biossegurança observados em laboratórios de pesquisa também estão presentes no Biotério, acrescidos daqueles inerentes à própria manutenção e trabalho com os animais. Esses riscos podem ser classificados como acidentes ergonômicos, físicos, químicos e biológicos. Adicionalmente, os riscos podem ser agrupados de acordo com os componentes que integram o biotério, sendo eles: o animal, o homem e o meio ambiente.

RISCOS DE ACIDENTES

Em biotério, os riscos de acidentes são representados por qualquer circunstância que coloque o profissional ou animal em situação que possa afetar sua integridade, bem estar físico e moral. Os acidentes

mais frequentes com o pesquisador na experimentação animal envolvem procedimentos de administração de drogas por vias parenterais e cortes causados por perfurocortantes, ou mesmo cortes causados por gaiolas, tampas e outros materiais. Os pesquisadores e técnicos também estão sob riscos de quedas e esbarrões, que são aumentados quando há um arranjo físico inadequado no biotério. Também vale ressaltar o risco presente na utilização de equipamentos, como autoclaves e guilhotinas. Algumas situações que afetam o pesquisador/técnico também impõem risco aos animais. O transporte de gaiolas entre ambientes é um procedimento que deve ser realizado cautelosamente, considerando que as eventuais quedas e esbarrões que ocorram, também podem impactar fisicamente os animais. Dessa forma, salienta-se a importância de uma arquitetura ideal no biotério que atenda às normas de largura de corredores, portas, e ausência de batentes ou qualquer desnivelamento do piso. O pesquisador/técnico também deve estar atento à sua conduta e, por exemplo, transportar apenas um número restrito de animais e gaiolas por vez. Os usuários devem conhecer as regras do biotério e estar familiarizados com os procedimentos a serem adotados em casos de ferimento acidental.

RISCOS ERGONÔMICOS

Os riscos ergonômicos envolvem aquelas situações que podem afetar psicofisiologicamente o profissional, gerando desconforto ou problemas de saúde. De maneira geral, os riscos ergonômicos são causados por posição ortostática inadequada, móveis inadequados, levantamento e transporte manual de peso, longas jornadas de trabalho, rotinas estressantes, monotonia e repetitividade. Dessa forma, o transporte de animais entre salas também se torna um fator de risco devido à carga do peso transportado. É interessante chamar à atenção para a monotonia e repetitividade que são peculiares a determinados procedimentos experimentais envolvendo pesquisa animal. Na condução desses tipos de atividades, o pesquisador deve adotar estratégias que diminuam o impacto psicológico, tais como intercalar essas últimas com atividades mais dinâmicas e descanso. Essa estratégia também é importante porque evita possíveis acidentes causados pelo automatismo.

RISCOS FÍSICOS

São considerados riscos físicos, as diversas formas de energia que possam estar expostos os profissionais e animais de um biotério. São exemplos: ruído, vibrações, pressões anormais, temperaturas extremas, radiações ionizantes, radiações não ionizantes, ultrassom, materiais cortantes e pontiagudos etc. Na experimentação animal, diversos procedimentos e protocolos impõem riscos físicos aos animais e pesquisadores. A contenção física dos animais, se realizada de maneira inadequada, pode gerar traumatismo, dor e estresse, e em casos mais graves, a morte do animal. Para minimizar esses transtornos é importante que os animais sejam adaptados a esses procedimentos. Por outro lado, ao ocasionar estresse aos animais, o pesquisador se coloca em maior risco de lesões por mordeduras e arranhões. Os animais também se encontram sob risco na execução de protocolos experimentais que impõem condições, como calor, restrições alimentares, administração de substâncias (oral e parenteral) e cirurgias. A realização de todas as etapas de um procedimento experimental deve ser detalhadamente apresentada ao Comitê de Ética, que avaliará a sua pertinência e adequação ao objetivo do trabalho.

RISCOS QUÍMICOS

De maneira geral, consideram-se agentes de risco químico, as substâncias, compostos ou produtos que possam penetrar no organismo pela via respiratória nas formas de poeiras, fumos, névoas, neblinas, gases ou vapores, ou que, pela natureza da atividade de exposição, possam ter contato ou ser absorvido pelo organismo através da pele ou por ingestão. O principal agente químico que precisa de monitoramento em um biotério é a amônia. A substância se encontra na forma gasosa à temperatura ambiente e é formada pela ação de bactérias sobre os dejetos dos animais. O controle dos níveis de amônia depende de variáveis, como sistema de exaustão e climatização, umidade do ambiente, número de animais por gaiola e número de gaiolas no ambiente. Quando

são utilizadas estantes ventiladas o cuidado deve ser estendido desde o micro ao macroambiente. O inadequado controle dos níveis de amônia gera transtornos tanto aos animais experimentais quanto aos pesquisadores/técnicos.

Outra classe de agentes químicos que representa risco à biossegurança são os anestésicos voláteis. A utilização adequada desses agentes exige equipamentos de anestesia, que realizam uma mistura do anestésico com oxigênio e óxido de nitrogênio, como transportadores, permitindo uma adequada manutenção do estado de anestesia para o animal. Além disso, esses sistemas protegem o manipulador da exposição aos agentes anestésicos. Apesar disso, é comum que roedores sejam anestesiados pela sua alocação em recipientes contendo algodão embebido em anestésico. Esse procedimento é perigoso tanto para o animal quanto para o manipulador. O contato direto das mucosas do animal com o anestésico pode ser irritante, e a concentração da droga não é passível de mensuração. Por outro lado, esse procedimento gera exposição direta do manipulador à inalação da substância.

Também deve ser considerado que tudo o que o animal absorve também será excretado, portanto as substâncias-teste que são administradas nos experimentos devem ser eliminadas de alguma forma. Dessa forma, sempre existe a possibilidade de excreção de metabólitos ativos ou inativos através da urina, fezes, saliva, pele, pelos ou outros produtos de origem animal, e o protocolo de biossegurança deve garantir o processamento adequado dessas substâncias desde a excreção do animal até o descarte do material contaminado.

RISCOS BIOLÓGICOS

Os riscos biológicos são conferidos por bactérias, fungos, parasitos, vírus, entre outros. Os agentes de risco biológico podem ser agrupados em quatro classes por ordem crescente de risco, de acordo com os seguintes critérios: patogenicidade para o homem, virulência, modos de transmissão, disponibilidade de medidas profiláticas eficazes, disponibilidade de tratamento eficaz e endemicidade. A Classe de Risco 1 inclui agentes biológicos que não causam doenças nos homens ou animais adultos saudáveis. Os agentes biológicos da Classe de Risco 2 podem contaminar homens ou animais, contudo o potencial de propagação e disseminação é limitado, e já possuem medidas terapêuticas conhecidas e eficazes. Na Classe de Risco 3, estão agrupados agentes patogênicos potencialmente letais ou cuja transmissão possa ocorrer por via respiratória, mas que as medidas de tratamento e prevenção são conhecidas. Os agentes biológicos da Classe de Risco 4 constituem alto risco individual e para a comunidade, possuindo capacidade de ocasionar doenças humanas e animais de alta gravidade e capacidade de disseminação, além de ausência de medidas profiláticas ou terapêuticas eficazes.

É possível que o protocolo experimental envolva a inoculação de agentes patogênicos ao animal experimental e/ou ao homem. Nessa situação, o risco à biossegurança se potencializa e se torna ainda mais importante conhecer os procedimentos e segui-los cuidadosamente. A maneira mais adequada para manutenção de animais infectados é em gaiolas protegidas e isoladas do ambiente. O trabalho com patógenos não deve ser realizado em local movimentado, estando o acesso restrito a pessoas que manuseiam o material biológico. Além disso, o trânsito pelos corredores com animais infectados deve ser mínimo. O trabalho com OGMs também está sujeito a procedimentos rígidos.

Por outro lado, mesmo que os animais experimentais não estejam experimentalmente infectados, o manipulador deve os considerar potenciais carreadores de agentes patogênicos. Os líquidos biológicos e os sólidos, os quais manuseamos nos laboratórios, são, quase sempre, fontes de contaminação. Vírus e bactérias também podem se multiplicar no animal e são excretados da mesma maneira, de modo que o próprio animal atua como reservatório de infecção para outros animais e humanos que entram em contato com os animais ou com os produtos de origem animal. Dentre as espécies utilizadas para experimentação, os primatas não humanos são os que merecem maior controle por serem mais suscetíveis a infecções que são comuns ao homem.

A Biossegurança envolve o estabelecimento dos cuidados adequados para não haver contaminação

cruzada dos materiais, não contaminar o pesquisador/técnico, os equipamentos e o meio ambiente.

DESCARTE DE MATERIAIS

Um fator de risco particularmente importante ao meio ambiente envolve os procedimentos para descarte de resíduos de pesquisa que envolvem animais experimentais. Os resíduos laboratoriais são agrupados em resíduos infectantes, materiais perfurocortantes, resíduos químicos, resíduos radioativos e resíduos comuns. O manejo deve ser feito de acordo com a sua categoria, seguindo condições estritas para segregação, acondicionamento e transporte. É de suma importância a identificação dos resíduos, a fim de se garantir a segurança de quem os manipula. Os resíduos mais comuns gerados em biotério de experimentação são os classificados como infectantes e perfurocortantes.

Na experimentação animal, os resíduos infectantes incluem sangue, secreções, excretas, órgãos e carcaça do animal, além do material utilizado na cama dos animais, tal como maravalha e papel picado. Também nesse grupo, se enquadram os materiais utilizados na manipulação dos animais, como gazes, algodão, e equipamentos de proteção individual. Os equipamentos que entrarem em contato com resíduos infectantes devem sofrer desinfecção. O descarte deve ser realizado em sacos plásticos para o lixo tipo 1, com capacidade máxima de 100 litros, conforme indicação da NBR 9191/02 da ABNT. As lixeiras devem possuir tampas e ser submetidas a lavagem sempre que houver vazamento do saco, ou pelo menos uma vez por semana. Os sacos devem ser fechados, de modo que possam ser virados sem derramamento do conteúdo. Eles nunca devem ser abertos, e caso haja rompimento, o material deve ser envolvido por um novo saco sem que o primeiro seja descartado. Caso haja derramamento do conteúdo do saco, o material derramado deve ser coberto com solução desinfetante e recolhido, estando o manipulador equipado com os equipamentos de proteção necessários. O local do derramamento também deve sofrer o processo de desinfecção.

Os resíduos perfurocortantes gerados com mais frequência na experimentação animal incluem agulhas e lâminas de bisturi. Esses resíduos constituem risco de acidentes físicos e biológicos. O descarte de resíduos perfurocortantes deve ser realizado em recipientes de parede rígidas com tampa, e sua localização deve estar tão perto quanto possível do local de utilização do material a ser descartado. Considerando a possibilidade dos resíduos perfurocortantes também serem infectantes, o recipiente deve ser embalado em saco adequado e o processo de descontaminação deve ser realizado. Durante o manuseio de seringas antes do descarte, a agulha não deve ser retirada entortada, quebrada ou recapeada.

O descarte de resíduos químicos e radioativos, embora menos comumente gerados na manutenção de animais experimentais, deve seguir os procedimentos adequados de acordo com a classificação de cada material. Os resíduos químicos devem ser tratados antes do descarte, e caso não haja possibilidade de recuperação, devem ser envasados de acordo com sua categoria em recipientes impermeáveis e com tampa rosqueada, com a devida identificação para posterior descarte. Os materiais radioativos apresentam características especiais e os manipuladores precisam ter conhecimento das técnicas de manuseio seguras e regulamentações de seu uso e descarte. Os resíduos radioativos deverão ser acondicionados em depósitos de decaimento com as devidas identificações (isótopo, produto químico, concentração, volume do conteúdo, data do descarte) até que suas atividades se encontrem dentro do limite permitido para sua eliminação. Resíduos radioativos líquidos e sólidos não devem ser misturados. Equipamentos utilizados para manipulação dos resíduos também devem ser descartados, tais como luvas, seringas, ponteiros etc. Considerando que um animal experimental tenha sofrido exposição direta a um isótopo radioativo, o descarte do animal e fluidos biológicos deve ser ajustado de acordo com a presença de material.

Os resíduos comuns são aqueles não categorizados, conforme as características anteriormente apresentadas, e que devem sofrer o descarte comum, de maneira semelhante aos resíduos domésticos.

BOAS PRÁTICAS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Como abordado anteriormente, com a finalidade de diminuir riscos, a Biossegurança contemplará a adoção de procedimentos e medidas de proteção. Inicialmente, o homem, como elemento central na prevenção de riscos, deve ter conhecimento dos requisitos gerais que são necessários para a manutenção da Biossegurança. Dessa forma, é fundamental a capacitação dos técnicos e pesquisadores na manipulação dos animais experimentais, bem como que eles apresentem conhecimento dos riscos oferecidos pelos procedimentos experimentais executados. Aos chefes de equipes e responsáveis técnicos pelo Biotério, cabe a orientação dos usuários e fiscalização do cumprimento de regras e da adoção de boas práticas de segurança.

As principais causas de acidentes em Biotério são a falta de treinamento, conhecimento ou experiência. Dessa forma, a frequência de acidentes é mais elevada em usuários iniciantes. Por outro lado, esse risco diminui conforme o pesquisador/técnico ganha maior domínio dos procedimentos experimentais envolvendo os animais. Paradoxalmente, o risco volta a aumentar conforme o profissional se torna mais experiente. Isso ocorre, em virtude de questões, como o excesso de confiança e automatismo procedimental. Dessa forma, o risco de acidentes em um biotério em relação ao tempo de experiência de um profissional, se estabelece como uma curva em “U” (Figura 2). Dessa forma, é fundamental que os profissionais se submetam continuamente a cursos de atualização às normas de Biossegurança.



Figura 2 – Relação entre o risco de acidentes e tempo de experiência profissional

Fonte: Próprio autor.

Além de conhecimento e treinamento, os usuários do biotério devem estar sempre atentos às boas práticas na experimentação animal. As condições de limpeza adequada do Biotério também devem ser mantidas sempre. A equipe responsável pelo Biotério deve estabelecer um cronograma de limpeza de equipamentos e gaiolas. Durante o transporte e procedimentos, deve-se tomar cuidado nos locais nos quais as gaiolas são apoiadas. Nunca se deve colocar as gaiolas, contendo animais no chão, assim como, elas não devem ser empilhadas. Os usuários devem manter as bancadas limpas após a utilização. Além disso, a higiene pessoal é fundamental para o controle de infecções; a higienização das mãos deve ocorrer no acesso e na saída do biotério, sendo recomendada a utilização de dois pares de luva para o descarte do par exterior sempre que necessário. Assim como em qualquer Laboratório, os usuários não devem comer, beber ou fumar. Também não devem ser utilizados cosméticos porque além de carreadores de micro-organismos, essas substâncias podem apresentar odor que incomode os animais.

As Boas Práticas também exigem a cautela dos usuários. Para sua proteção, os usuários devem controlar os atos de levar as mãos à boca, nariz, olhos, rosto ou cabelo, no laboratório. A presença de qualquer tipo de lesão na pele ou conjuntivas é uma restrição para o trabalho com animais, a não ser que as áreas de lesão possam ser protegidas. Os usuários devem se manter atentos ao surgimento de alterações de sua saúde, como alergias, gripes e diarreia.

Um aspecto importante na conduta do técnico/pesquisador é a organização. O Biotério e as salas de experimentação devem sempre ser mantidas organizadas e limpas. Se encontrar algum material ou equipamento fora de lugar, o usuário deve ter a iniciativa de organizar. A identificação de desordem, equipamentos quebrados ou atitudes inadequadas devem ser prontamente comunicadas ao responsável. Antes de manutenção, os equipamentos do biotério devem sofrer descontaminação. Os protocolos experimentais devem ser cuidadosamente planejados com antecedência, ou seja, o experimentador deve saber todos os procedimentos que serão realizados e os materiais que serão necessários. O tempo para realização das atividades também deve ser adequadamente organizado. A falta de tempo pode induzir o experimentador/técnico a realizar o trabalho com maior rapidez, tomar um caminho mais curto e não seguir as boas práticas de biossegurança. A organização minimiza o trabalho sob tensão e, dessa forma, os riscos de acidentes.

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO

Os equipamentos de proteção são fundamentais na Biossegurança, minimiza os riscos à segurança e à saúde no trabalho. Suas funções básicas envolvem a proteção do pesquisador, a proteção e a prevenção de doenças relacionadas aos animais e à proteção do experimento. Os equipamentos de proteção são classificados em equipamentos de proteção coletiva (EPCs) e equipamentos de proteção individual (EPIs).

Os EPCs são aqueles equipamentos utilizados para atender a vários trabalhadores ao mesmo tempo. Esses equipamentos são complementares às características da infraestrutura do Biotério destinadas à proteção dos trabalhadores, animais, meio ambiente e pesquisa, tais como sistema de ventilação, autoclave, recipientes para rejeitos etc. Os principais exemplos de EPCs incluem as capelas e cabines de segurança química e biológica, chuveiro de emergência, lavador de olhos e extintor de incêndio. Embora não tenham importância exclusivamente no Biotério e laboratórios, os equipamentos de combate a incêndio também estão inclusos nos EPCs.

As capelas e cabines de segurança são barreiras primárias para evitar a fuga de aerossóis. Elas são classificadas de acordo com o grau de isolamento entre seu interior e o ambiente. A sua utilização com animais experimentais é necessária para a manipulação de animais infectados ou manipulação de animais que precisam de proteção contra contaminação. As cabines de segurança biológica devem estar localizadas em áreas de pouco trânsito, e a ventilação do ambiente deve minimizar a turbulência do ar na área externa.

Os chuveiros de emergência e o lava-olhos são importantes para condições de emergência, devendo estar em locais de fácil acesso. O chuveiro de emergência apresenta cerca de 30cm de diâmetro, sendo que o seu acionamento é executado através de alavancas de mão, cotovelos ou joelhos, e libera rapidamente um alto fluxo de água. Esse EPC apresenta uma maior importância para os riscos de acidentes químicos. Por outro lado, o lava-olhos pode ter uma maior importância na rotina do Biotério, por exemplo, em circunstâncias em que respingos de material biológico atinjam os olhos do pesquisador. O EPC é composto por duas pequenas duchas de média pressão acopladas a uma bacia, podendo estar acoplado à estrutura de um chuveiro de emergência. O seu acionamento também deve ocorrer através de estruturas que permitam sua realização com facilidade e rapidez. Os usuários devem estar sempre conscientes da localização mais próxima do lava-olhos, chuveiro de segurança e extintor de incêndio.

Os EPIs são representados por todo dispositivo ou produto cujo uso seja individual e destinado à proteção do trabalhador de riscos à sua segurança e à saúde no trabalho. Os EPIs são projetados para proteção das diversas partes do nosso organismo. O usuário do Biotério deve garantir a utilização de proteção para

corpo, membros inferiores e superiores, cabeça, olhos e face. Cada usuário deverá vestir: touca de proteção descartável, máscara de proteção descartável, avental descartável e sapatilhas pró-pé descartáveis.

A proteção da cabeça é dependente do uso de máscara, touca e óculos de proteção. A touca protege os cabelos e o couro cabeludo. Os óculos de proteção protegem os olhos e a conjuntiva ocular. Esse item é particularmente importante para proteger o experimentador contra respingos de fluidos biológicos, como sangue e urina. A utilização de óculos de proteção pode evitar que o experimentador utilize o lava-olhos na presença de acidentes. As máscaras protegem a cavidade oral e o trato respiratório.

A proteção do corpo, membros superiores e inferiores é garantida pela utilização de jalecos (também chamados de aventais) e vestimentas adequadas. Os jalecos fornecem barreira de proteção para o corpo e membros superiores, além das roupas dos usuários, contra a transmissão de microrganismo, derramamento de material infectado e respingos de fluidos e excretas biológicas. Os jalecos podem ser confeccionados em algodão ou fibra sintética, sendo reutilizáveis ou descartáveis. Os jalecos devem ter mangas longas e ser não inflamáveis, resistentes e impermeáveis. As boas práticas de Biossegurança exigem diversos cuidados na utilização do jaleco: utilizar inteiramente abotoado, não misturar com outros objetos pessoais, descontaminar antes da lavagem e utilizar apenas em ambientes de trabalho. Os usuários devem utilizar jalecos distintos para as atividades do Laboratório e do Biotério. As vestimentas também são fundamentais para a proteção do experimentador/técnico. É preferencial a utilização de roupas de algodão. A calça deve cobrir até o tornozelo e o calçado deve ser fechado. Também é possível que as regras do Biotério exijam a utilização de proteções descartáveis para os calçados, os pró-pés. Não deve ser permitido a utilização de adornos, como relógios, pulseiras, anéis e colares.

A proteção dos membros superiores é completada pelo uso de luvas. Apesar de ser um item fundamental para proteção, a conduta inadequada do trabalhador ao utilizar luvas contaminadas é um potencial risco à Biossegurança. As luvas só devem tocar o material necessário para a atividade a ser desempenhada, e o usuário deve ter grande cuidado para não contaminar inadvertidamente maçanetas, interruptores e equipamentos. O trabalhador não deve deixar a área de trabalho equipado com as luvas utilizadas, mesmo que a saída seja temporária (assim como jalecos, máscaras e toucas). As luvas não devem ser reutilizadas. O uso de luvas não exime a responsabilidade da lavagem adequada das mãos, que deve ocorrer antes e após o procedimento experimental.

Os EPIs apresentam uma ordem adequada de vestimenta e de retirada. A sequência de vestimenta é jaleco, máscara, óculos, gorro e luvas. Isso garante que as luvas estejam livre de possível contaminação pelo toque com os demais EPIs. A sequência de retirada não é recíproca à vestimenta; ela segue a ordem, luvas, gorro, óculos, jaleco e máscara. A retirada da máscara por último, garante proteção ao pesquisador contra possíveis partículas suspensas durante a retirada dos demais EPIs. O descarte deve ser realizado em lixo para material contaminante. Os EPIs reutilizáveis devem ser descontaminados antes de realizada sua lavagem. É indicado que os biotérios possuam ambientes destinados à paramentação dos pesquisadores/técnicos. Além disso, alguns apresentam divisões físicas entre áreas sujas e limpas, tanto para evitar a contaminação dos usuários quanto dos animais, estando o vestiário localizado na área suja. Nessa configuração, o pesquisador/técnico nunca deve acessar a área limpa com os mesmos EPIs utilizados na área suja.

CONCLUSÃO

A manutenção da Biossegurança no Biotério e Laboratório, o monitoramento dos parâmetros genéticos, sanitários, nutricionais e ambientais dos animais, bem como o compromisso com a ética em pesquisa, geram resultados experimentais de maior confiabilidade e reprodutibilidade, diminuindo o número de animais utilizados e aumentando a qualidade da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, Monica Levy; D'ALMEIDA, Vânia; KO, Gui Mi; KAWAKAMI, Regiane; MARTINS, Paulo José Forcina; MAGALHÃES, Luiz Edmundo; TUFIK, Sergio. **Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação**. 1. ed. São Paulo: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2004. 167 p.

ANDRADE, Antenor. Biossegurança em biotérios. In: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sérgio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. p. 381-387. ISBN 85-7541-015-6.

BAHIA. Secretaria da Saúde. Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde. Diretoria de Vigilância e Controle Sanitário. BRASIL. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Manual de Biossegurança. Salvador. 2001.

CARDOSO, Telma Abdalla de Oliveira. Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios. **Boletim del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, [s. l.], p. 3-17, 1998 2001.

BRASIL. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Comissão Técnica de Biossegurança da FIOCRUZ. **Procedimentos para a manipulação de micro-organismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2005. 221 p.

MAJEROWICZ, Joel. **Boas Práticas em Biotérios: Biossegurança**. 1a. ed. [S. l.]: Editora Interciência, 2008. 176 p. ISBN 9788571931930.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 36 p. ISBN 85-334-1216-9. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/classificacao_risco_agentes_biologicos.pdf. Acesso em: 31 jul. 2021.

MOLINARO, Etelcia Moraes; MAJEROWICZ, Joel; VALLE, Silvio. **Biossegurança em Biotérios**. 1a. ed. [S. l.]: Editora Interciência, 2008. 222 p. ISBN 9788571931800.

RIVERA, Ekaterina Akimovna B. Anestesia em animais de experimentação. In: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sérgio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. p. 255-262. ISBN 85-7541-015-6.

CAPÍTULO 8

MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS MAIS UTILIZADAS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Data de aceite: 01/03/2022

Valéria Nunes de Souza

Profa. Dr.^a Universidade Federal de Pernambuco

INTRODUÇÃO

Toda amostra biológica está sujeita a diversas variações, as quais refletem diretamente nos resultados, sejam elas biológicas, pré-analíticas ou analíticas. Além de saber como e as diferentes maneiras de administração de substâncias e coleta de material biológico, o escopo do presente capítulo destaca a importância de evitar tais variações para obtenção de uma amostra de qualidade.

A variação biológica é aquela causada por alterações nas condições de alojamento e experimentação animal. Quando se pensa na qualidade da amostra biológica, estas condições podem representar tanto um grande aliado quanto um inimigo. Os roedores são muito susceptíveis às variações das condições de manutenção. Nesse sentido, o ciclo claro-escuro, a temperatura, a umidade, a frequência de limpeza e os sons no biotério constituem como os principais parâmetros que devem ser controlados para evitar o estresse do animal, pois isso pode modificar respostas fisiológicas e, conseqüentemente, a amostra a ser coletada, o que resulta em erros de interpretação, invalidação dos resultados e comprometimento da pesquisa.

A variação pré-analítica é aquela causada durante a experimentação *in vivo*, nos processos de administração de substâncias e coleta de amostras biológicas, decorrentes, principalmente, de falta de treinamento prévio, falta de padronização, utilização de material inadequado na coleta, identificação incorreta das amostras, demora no processamento das amostras

e no armazenamento inadequado.

A variação analítica constitui variações durante o processamento (ensaios) da amostra biológica. São decorrentes de erros no preparo das amostras (Ex.: diluição incorreta, contaminação), na preparação de reagentes, erros de pipetagem, utilização de equipamentos não calibrados ou em manutenção precária, e até mesmo erro nas análises dos dados (Ex.: erro de digitação, análise estatística incorreta).

MÉTODOS DE COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS EM ROEDORES

Sangue

O sangue é uma das amostras biológicas mais coletadas na experimentação animal e pode ser obtido de diversas maneiras a depender do tamanho e saúde do animal, da qualidade e quantidade do sangue e da frequência de coleta. Tais parâmetros definirão se a coleta deverá ser realizada no animal contido ou anestesiado. Além disso, deve-se considerar a influência do anestésico no parâmetro a ser analisado na amostra coletada.

De um modo geral, a coleta de sangue exerce um impacto negativo, principalmente quando realizada sem anestesia, visto ser um procedimento invasivo e doloroso associado aos efeitos da perda de sangue. É importante frisar que, a depender do método de coleta, a amostra biológica pode ser contaminada pelo contato com pele e pelos dos animais. Nesse sentido, antes de determinar a quantidade de sangue que pode ser coletada de um roedor, é necessário saber quanto de volume sanguíneo total ele possui e quanto pode ser coletado sem causar alterações clínicas relevantes. Para tanto, pode-se determinar o volume total de sangue circulante a partir do peso corporal do roedor. Assim, como representativo

do volume de sangue total, calcula-se 10% do peso corporal dos ratos e 6-8% dos camundongos. Desta forma, ratos adultos, com peso corporal de 250mg, possuem ~25mL de sangue total circulante. O volume a ser coletado deve ter como base, além do volume total circulante, o intervalo de recuperação após a coleta, visto que o volume do sangue é recuperado em 24 horas, porém os eritrócitos retornam aos níveis normais somente em duas semanas, em função do tempo necessário para a eritropoiese. Assim, em regras gerais, para a coleta de sangue tem-se:

- Volume máximo aceitável de 10% do volume de sangue circulante de um roedor adulto/duas semanas;
- Coletas frequentes não exceder 7,5% do volume de sangue circulante/semana;
- Regra de ouro: <1% do volume de sangue circulante/dia.

Após centrifugação do sangue total coletado, obtém-se ~55% de plasma (fase superior), <1% de leucócitos e plaquetas (fase intermediária) e ~45% de eritrócitos (fase inferior). Sugere-se como parâmetro para centrifugação do sangue: 3.000 a 4.000 rpm, durante 10 a 15 minutos a 4 ± 2 °C. Para a obtenção de plasma, coleta-se o sangue total em um tubo contendo anticoagulante (Ex.: heparina, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ou citrato de sódio). Por outro lado, para obter soro, o sangue total é coletado em tubo sem anticoagulante e deixado à temperatura ambiente durante 30 minutos para formar o coágulo de sangue ou utiliza-se tubo contendo ativador de coágulo.

Veia caudal

A obtenção de sangue pela veia caudal não necessita de anestesia e é preferível quando se deseja a coleta de pequenos volumes sanguíneos, como, por exemplo, para a mensuração da glicemia com glicosímetro. Quando realizada em ratos, após a devida assepsia com etanol 70%, um pique com agulha (22-23G) no final da cauda é suficiente para se obter pequenas gotas de sangue, as quais podem ser utilizadas diretamente na mensuração glicêmica ou coletadas, com capilar, para serem centrifugadas e utilizadas posteriormente.

Em camundongos, um pequeno corte (1mm) da extremidade final com tesoura bem amolada é preferível ao pique com agulha para a coleta sanguínea (Figura 1). Lateralmente na cauda, as veias são bastante visíveis em roedores albinos e tornam-se ainda mais visíveis quando da indução do aumento do fluxo sanguíneo por imersão da cauda em um recipiente contendo água morna (38-39 °C) por 10 segundos (Figura 1), o que permite a coleta de um volume maior. Entretanto, para uma coleta lateral faz-se necessário a contenção do roedor em contensor de tamanho adequado. Na ausência de um contensor específico para camundongos, pode-se cortar a extremidade de um tubo tipo "Falcon" de 50mL e utilizá-lo, conforme mostra a figura 1. Na sequência a assepsia da cauda com etanol 70%, introduz-se uma agulha (23G-26G) para a realização da coleta. Pode-se ainda utilizar um capilar para coletar o sangue diretamente do bulbo da agulha. Após finalizar a coleta, comprima uma gaze seca e estéril no local para parar o sangramento, assegurando-se da hemostasia antes de retornar o animal para a gaiola. A figura 1 mostra a contenção do roedor em contensor, bem como a coleta sanguínea através da veia caudal.

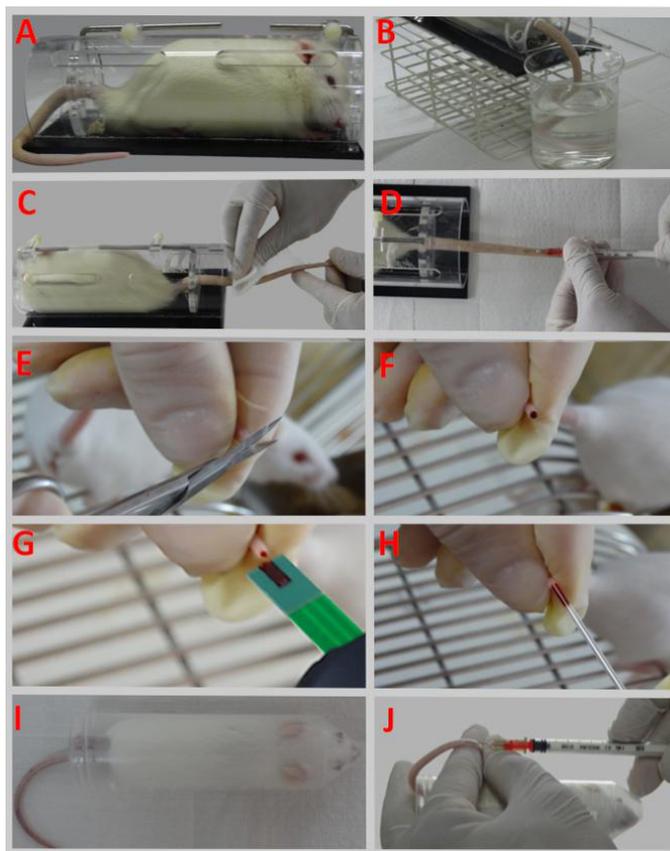


Figura 1 – Coleta sanguínea através da veia caudal.¹

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Veia safena

Permite a obtenção repetida de um pequeno ou médio volume sanguíneo sem anestesia, porém a contenção do roedor é requerida. Para a coleta através da veia safena, localizada na superfície externa da coxa (Figura 2), deve-se raspar o pelo da área e fazer uma compressão descendente suave pouco acima do joelho, na base da perna, para a melhor visualização da veia. Esta é puncionada com agulha 20G. Após a coleta, comprima uma gaze estéril no local da punção para parar o sangramento.

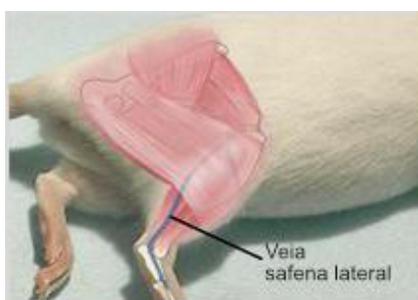


Figura 2 – Veia safena lateral.

Fonte: http://www.theodora.com/rodent_laboratory/blood_collection.html.

¹ A: Rato em contensor; B: Imersão da cauda em um recipiente contendo água morna (38-39 °C); C: Assepsia da cauda com etanol 70%; D: Coleta sanguínea através da veia caudal em rato; E: Pequeno corte (1 mm) da extremidade final da cauda de camundongo; F: Saída de sangue após corte da extremidade da cauda; G: Coleta de sangue para mensuração de glicemia com glicosímetro; H: Coleta de sangue da extremidade da cauda com capilar heparinizado; I: Contenção de camundongo em tubo tipo "Falcon" de 50mL; J: Coleta sanguínea através da veia caudal em camundongo.

Veia facial

Permite a obtenção de médio ou grande volume sanguíneo sem anestesia, porém com contenção do roedor. Após a assepsia, punciona-se com agulha (22-25G) a região atrás da marca localizada na bochecha do animal (marca do masseter – seta vermelha - Figura 3) e coleta-se o sangue em tubo ou capilar heparinizado. Para estancar o sangramento utiliza-se uma gaze estéril para comprimir o local da punção, o qual fechará em 1 minuto.

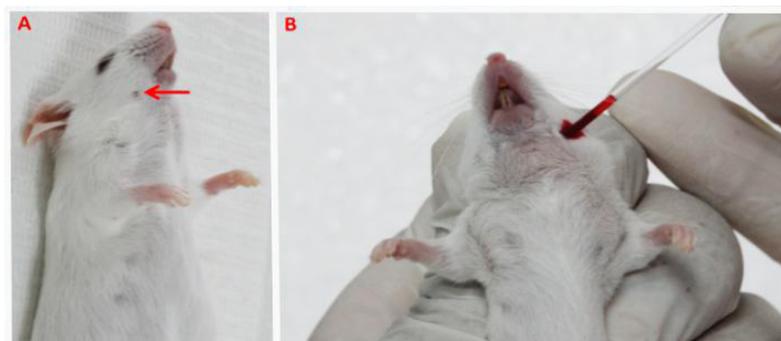


Figura 3: Coleta sanguínea através da veia facial. A: Marca do masseter (seta vermelha), local onde deve ser puncionado para coleta de sangue; B: Coleta de sangue com tubo capilar heparinizado.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Retro orbital

Permite a obtenção de grande volume sanguíneo com boa qualidade. Entretanto, necessita de anestesia além da contenção do animal. A anestesia pode ser local (oftálmica) ou geral com efeito de duração rápida, uma vez que o procedimento é rápido de realizar. Essa técnica só deve ser realizada por operador bem treinado, pois pode-se causar cegueira no animal. O seio venoso retro orbital localiza-se abaixo da membrana conjuntival. Assim, com uma pipeta Pasteur ou capilar deve-se inserir no canto do olho (seta vermelha – Figura 4) em um ângulo de 45° com movimento rotacional suave avançando o tubo através da membrana conjuntival, conforme mostra a figura 4, o sangue fluirá por capilaridade. Após a coleta, comprima uma gaze estéril no local para parar o sangramento, com cuidado para não arranhar a córnea.

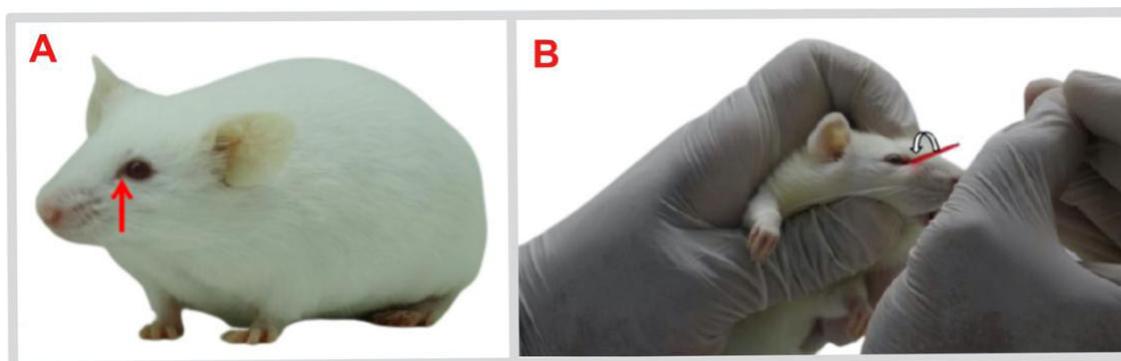


Figura 4 – Coleta sanguínea via retro orbital. A: Localização para penetração do capilar; B: Penetração no canto do olho em um ângulo de 45° girando levemente

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Veia jugular

O método deve ser realizado com o roedor anestesiado e com o pescoço e a cabeça na posição distendida (para trás), posição de melhor visualização das veias jugulares, as quais são encontradas lateralmente à junção

esternoclavicular. A região do pescoço deve ser depilada ou molhada com etanol 70%. A agulha (25G) é inserida na veia de 1-3 mm de profundidade (direção caudocefálica) e o sangue coletado lentamente com a agulha imóvel. Após a coleta, aplica-se uma pressão com o dedo para parar o sangramento.

Punção cardíaca

Este procedimento permite a coleta de uma grande quantidade de sangue, requer anestesia profunda e só deve ser realizado quando da eutanásia do roedor. Após anestesia e verificação de ausência de movimentos espontâneos e resposta a estímulos, a região do tronco deve ser esterilizada com etanol 70% para localização do processo xifoide. Em um ângulo de 45°, insere-se uma agulha (20-23G com seringa de 1-5mL), com o bisel voltado para cima e levemente inclinada para esquerda da linha média logo abaixo da cartilagem xifoide, aspira-se lentamente com pressão constante e observa-se o sangue fluir, o que indica que o coração foi alcançado (Figura 5). Em caso positivo, puxa-se o êmbolo devagar e sem mover a seringa. O sangue fluirá com facilidade. Após encher a seringa, caso seja necessário mais volume de sangue, retire-a com cuidado deixando a agulha no local, esvazie a seringa em tubo e reconecte-a novamente na agulha para continuar a coleta. Caso não tenha acertado o coração, puxe um pouco a agulha sem retirá-la completamente da região torácica, mude um pouco a angulação e introduza novamente. Se ainda assim o sangue não fluir, faça uma pequena incisão abaixo da cartilagem xifoide (na linha média), pince-a e eleve-a de tal forma que consiga visualizar o coração através do diafragma, afaste delicadamente o fígado inferiormente caso ele esteja atrapalhando a visão do diafragma, agora ficará mais fácil a inserção da agulha e aumenta a chance de sucesso da punção. Imediatamente após a coleta o roedor deve ser eutanasiado. Para isso, abra rapidamente a região do tronco e rompa o diafragma.



Figura 5: Punção cardíaca. A: Punção cardíaca em rato com cavidade fechada; B: Punção cardíaca em rato após incisão abaixo da cartilagem xifoide (na linha média) e visualização do coração através do diafragma.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Decapitação

Não necessita anestesia em roedores pequenos, porém acima de 250g, a anestesia é requerida para evitar estresse na contenção. Permite obtenção de grande volume sanguíneo. Utiliza-se de um equipamento especial, tipo guilhotina, a qual deve estar bem afiada, a fim de realizar a decapitação de uma vez, evitando assim o sofrimento do animal. Imediatamente após a decapitação, deve-se coletar o sangue que “jorra” da região

cervical decapitada com um tubo tipo “ependorf®”. Uma desvantagem dessa técnica é a possível contaminação do sangue com o pelo e a pele do roedor.

TECIDOS

Conhecer a anatomia e fisiologia do animal é fundamental para realizar uma coleta tecidual fidedigna. Nesse sentido, sugere-se a leitura do capítulo que trata de aspectos fisiológicos de rato e camundongo. Um ponto importante a ser destacado, quando se trata da coleta de órgãos, é a retirada das influências adjacentes de outros tecidos, geralmente o tecido adiposo, como mostrado na Figura 6, uma vez que influenciará em análises gerais, como massa tecidual, bem como em análises mais sofisticadas, como as moleculares (expressão gênica e proteica). Abordaremos neste tópico alguns cuidados essenciais durante a coleta de tecidos.

Independentemente do tipo de amostra biológica, a coleta deve ser realizada da forma mais asséptica possível e os materiais descartáveis utilizados (ex.: agulhas, seringas, tubos) devem ser novos e/ou esterilizados. Os órgãos devem ser coletados e armazenados imediatamente após a eutanásia dos animais, para evitar que as reações *post mortem* interfiram nas análises a serem realizadas. Para tanto, utilize gelo seco ou nitrogênio líquido para o congelamento rápido de tecidos e/ou fluidos até o armazenamento em freezer -20 ou -80°C.



Figura 6: Tecido adiposo circundando a aorta torácica, os rins, a adrenal e o tecido adiposo marrom de camundongos.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Na coleta de tecidos destinados a análises histológicas, o fragmento deve ter de 0,5cm a 1,0cm de espessura. O frasco de coleta contendo a solução pré-fixadora (proporção tecido/pré-fixador de 1:10 ou 1:20) deverá ser de boca larga, preenchido totalmente com a solução e vedado até o processamento (tempo máximo nessa solução de 16-24h, na sequência, conservar em etanol 70% até a inclusão em parafina). Utiliza-se frasco de penicilina, coletor universal e até mesmo tubo para centrifugação tipo “Falcon” para este armazenamento com pré-fixador. Dentre as soluções pré-fixadoras têm-se o formol 10%; a formalina tamponada a 10% (uma vez que o ácido fórmico é uma impureza nociva à fixação dos tecidos, sugere-se a neutralização); a solução de “Bouin” (composto por ácido pícrico, ácido acético e formaldeído). Utiliza-se um Crioprotetor, do inglês *Optimal Cutting Temperature* (OCT) nos tecidos coletados para uma variedade de análises, como imunohistoquímica ou para detecção enzimática *in situ*. O OCT evita o ressecamento do tecido a temperaturas baixas, reduz a formação de cristais de gelo e minimiza os danos morfológicos, além de fornecer uma matriz para as amostras facilitando a execução de cortes a temperaturas $\leq -10^{\circ}\text{C}$, em criostato.

Na coleta de tecidos para as análises de biologia molecular (gênicas, proteicas, enzimáticas), os cuidados devem ser redobrados, principalmente, com relação ao tempo entre coleta e armazenamento, visto que as reações químicas são bastante rápidas e quanto mais tempo se passa na coleta, maior a chance de erro e resultados falsos negativos para o parâmetro a ser analisado. Nesse sentido, o congelamento deve ser imediato. Se o tecido será utilizado para análise gênica é importante frisar a necessidade de utilizar tubos livres de RNases, Dnases, as quais degradam o RNA e DNA e são resistentes a diversos tratamentos, inclusive térmicos. Além

disso, durante o experimento utiliza-se soluções preparadas com água contendo dietilpírocarbonato (DEPC), um inibidor de RNase.

Na coleta de tecidos, independentemente do tipo de experimento, deve-se evitar o congelamento/descongelamento das amostras biológicas (tecidos e fluidos), visto que causa ativação e inativação de enzimas e, conseqüentemente, a degradação da amostra, inviabilizando-a. Nesse sentido, sugere-se o armazenamento (-80°C) de fluídos em alíquotas e diversos pequenos cortes para os tecidos, dependendo da quantidade de experimentos que se deseja realizar. Sugere-se ainda que as extrações (gênicas e proteicas) das amostras sejam realizadas dentro de um ano, e que na extração proteica utilize-se tampão de lise celular contendo inibidores de proteases e fosfatases.

FEZES E URINA

A coleta não invasiva de urina e fezes necessita de gaiola metabólica. Entretanto, uma alternativa para coleta dessas amostras é durante a eutanásia. As últimas fezes, próximo ao reto (círculo vermelho – Figura 7A), podem ser coletadas para análise, uma vez que são fezes prontas para excreção. A coleta pode ser feita “empurrando” as fezes em direção ao reto com a ajuda de uma pinça. Logo após a eutanásia do roedor, a urina pode ser coletada com uma seringa diretamente da bexiga, caso esta contenha urina (círculo vermelho – Figura 7B).

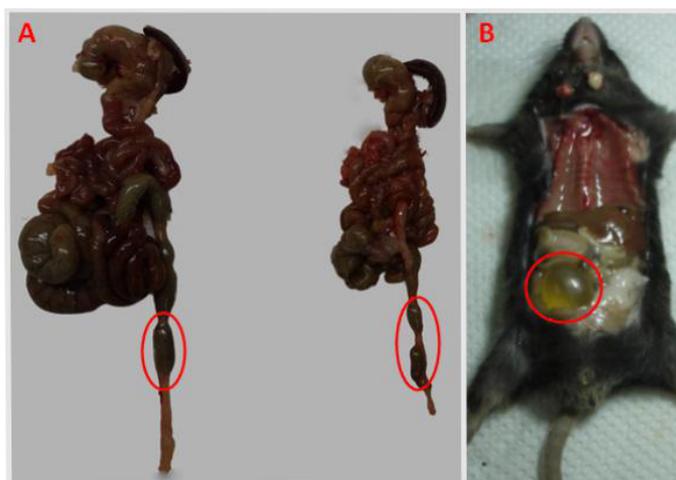


Figura 7: A: Trato gastrointestinal de rato (esquerda) e camundongo (direita) mostrando às fezes que podem ser coletadas para análise (círculos vermelhos); B: Bexiga de camundongo cheia de urina.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO EM ROEDORES

Diversos parâmetros devem ser considerados para a escolha da via de administração, a saber, o início desejado da ação, as propriedades químicas, pH, esterilidade, toxicidade, viscosidade da substância etc. O início desejado da ação varia de forma decrescente entre os seguintes tipos de rota: intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, intradérmica e oral. As propriedades da substância e o metabolismo delas no organismo devem ser levados em conta antes da escolha da melhor via de administração, visto que algumas rotas interferem na substância e vice-versa.

A substância administrada deve ser diluída em veículo apropriado em um volume máximo adequado para a via de administração escolhida. Nesse sentido, o volume do fluido administrado deve ser levado em consideração para cada via de administração. Na tabela 1 lista-se o volume ideal para cada via de administração.

Via	Volume (mL.kg ⁻¹)
Intravenosa (i.v.)	Até 5 (bolus) e 2 por hora (infusão contínua)
Intraperitoneal (i.p.)	Máximo de 10
Intramuscular (i.m.)	Máximo de 0,05 por local
Subcutânea (s.c.)	Máximo de 5 por local
Intradérmica (i.d.)	0,05-0,1 por local
Oral (VO)	5

Tabela 1 – Volumes recomendados para administração de substâncias por diferentes vias em roedores

Fonte: Turner *et al.* (2011) e Morton *et al.* (2001).

Via intravenosa (i.v.)

O animal deve ser colocado em contensor. Após imersão da cauda em um recipiente contendo água morna (38-39°C) para melhor visualização da veia e assepsia do local, insere-se a agulha de pequeno calibre (26-28G para camundongo e 25-27G para rato) paralela à veia da cauda (geralmente da parte média para a região distal), penetrando suavemente de 2 a 4 mm para o lúmen, mantendo o bisel da agulha com a face para cima (Figura 8), pode-se utilizar cateter do tipo borboleta. Deve-se aspirar levemente para confirmar que o local é o vaso, mas com cuidado para não causar colapso da veia. Na sequência, injeta-se lentamente a solução. Ao final, retira-se a agulha e aplica-se pressão com uma gaze no local para garantir a hemostasia. A vantagem dessa via sobre as outras é que podem ser administradas soluções com pH alto ou baixo.

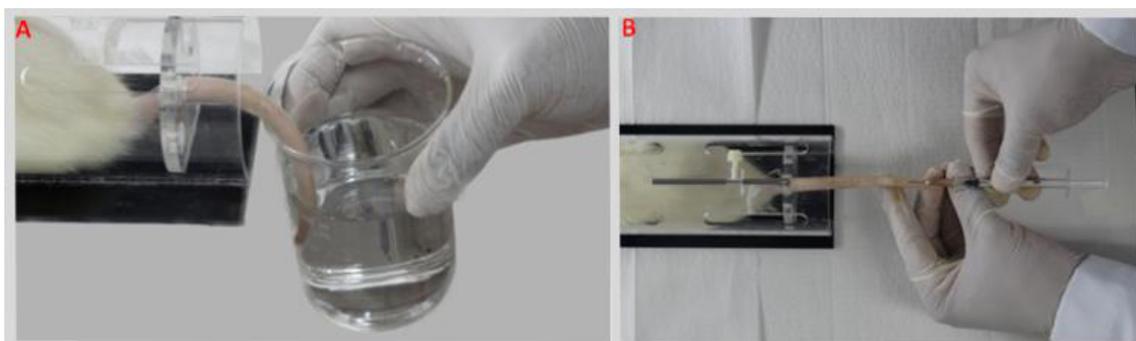


Figura 8: A: Imersão da cauda em um recipiente contendo água morna (38-39 °C); B: Inserção da agulha paralela à veia caudal para aplicação intravenosa em rato.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Via intraperitoneal (i.p.)

A administração por esta via é realizada no terço inferior do abdômen (geralmente quadrante 3 ou 4, Figura 9), em um ângulo de 45°, aproximadamente. É necessário a contenção manual do roedor de maneira levemente inclinado e com a cabeça para baixo para evitar o risco de puncionar órgãos abdominais. Caso seja um roedor com tamanho maior que a mão do manipulador comporte, pode-se conter o animal sobre uma superfície de tal forma que ele se mova o mínimo possível (Figura 9D). Deve-se utilizar uma agulha de calibre pequeno (25-27G para camundongo e 23-25G para rato). Após a inserção da agulha no local e antes de administrar, deve-se aspirar para assegurar-se que nenhum órgão foi perfurado. Não havendo fluido na seringa, após aspirar, injeta-se suavemente a substância.



Figura 9: A: Quadrante de aplicação intraperitoneal; B: Aplicação intraperitoneal no terceiro quadrante de camundongo; C e D: Aplicação intraperitoneal no terceiro quadrante de rato em diferentes posições.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Via intramuscular (i.m.)

Esta via de administração é geralmente dolorosa e deve ser evitada sempre que possível. Em função disso, deve-se administrar um pequeno volume e, se necessário, aplicar em diferentes locais em administrações sucessivas. Um dos locais mais utilizados é na região atrás da coxa (Figura 10). Substâncias irritantes não devem ser administradas por esta via. O animal deve ser contido e após a introdução da agulha (27G para camundongo e 25G para rato), deve-se aspirar brevemente a seringa antes de injetar a substância, para certificar-se de que não penetrou um vaso, neste caso, sangue não deve ser visualizado na seringa. Após esta confirmação, injeta-se a substância lentamente. Na escolha da parte atrás da coxa, deve-se evitar lesionar o nervo ciático, que se estende ao longo do fêmur.



Figura 10: Administração intramuscular em rato na parte atrás da coxa.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Subcutânea (s.c.)

É uma via de administração preferida, a menos que a substância seja irritante localmente. Raramente induz dor e é realizada com animais conscientes, porém em boa contenção manual e de tal forma que o polegar e o indicador formem uma “onda” de pele em cima da cabeça/nuca. Para tanto, deve-se puxar uma quantidade generosa da pele solta sobre a nuca. O local de inserção da agulha (27G para camundongo e 25G para rato) para aplicação é na pele solta sobre o interescapular (na base da “onda” de pele formada), logo acima da cabeça (Figura 11).



Figura 11: Administração subcutânea em A: rato B: camundongo.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Intradermica (i.d.)

Esta via de administração requer anestesia e tricotomia do local. Geralmente não é recomendada, a não ser que seja um protocolo específico. Após a assepsia, a pele do animal deve ser esticada e a agulha (27G para camundongo e rato) inserida logo abaixo da camada superficial da epiderme, com a agulha quase paralela à pele. A substância deve ser injetada lentamente sem aspirar. A aplicação é constatada pela formação de uma bolha na pele do animal (Figura 12).



Figura 12: Administração intradérmica.

Fonte: Disponível em: http://www.theodora.com/rodent_laboratory/injections.html.

Oral (VO)

Esta via é frequentemente usada em administrações repetidas e a longo prazo. Entretanto, requer uma estabilidade da substância às secreções gástricas e não ser irritante ou corrosivo para a mucosa. Pode ser realizada por gavagem, com agulha apropriada e de tamanho específico para rato ou camundongo (agulha de alimentação com ponta de esfera), conforme mostra a figura 13, ou pode-se misturar a substância na dieta ou dissolvê-la na água de beber, caso a estabilidade da substância não seja alterada na mistura.

Para o procedimento de gavagem, o animal deve ser firmemente contido na mão do manipulador com o pescoço levemente estendido. A ponta da agulha deve ser deslizada suavemente pela língua do animal sem forçar, se for colocada corretamente a agulha deslizará com facilidade pelo esôfago e o material poderá ser administrado. A agulha não deve ser rotacionada depois de introduzida no animal, visto que a ponta da agulha pode romper o esôfago. A vantagem da via por gavagem é a administração da dose exata, com intervalos de tempo bem controlados. Entretanto, pode causar estresse diário, bem como a administração incorreta pode levar a perda do animal, caso a substância seja administrada no trato respiratório em vez do trato gastrointestinal ou o esôfago for perfurado. A mistura da substância a ser administrada na comida ou água de beber requer uma medida prévia de consumo alimentar sólido ou líquido por animal para ajuste de dose, a qual não será exata.

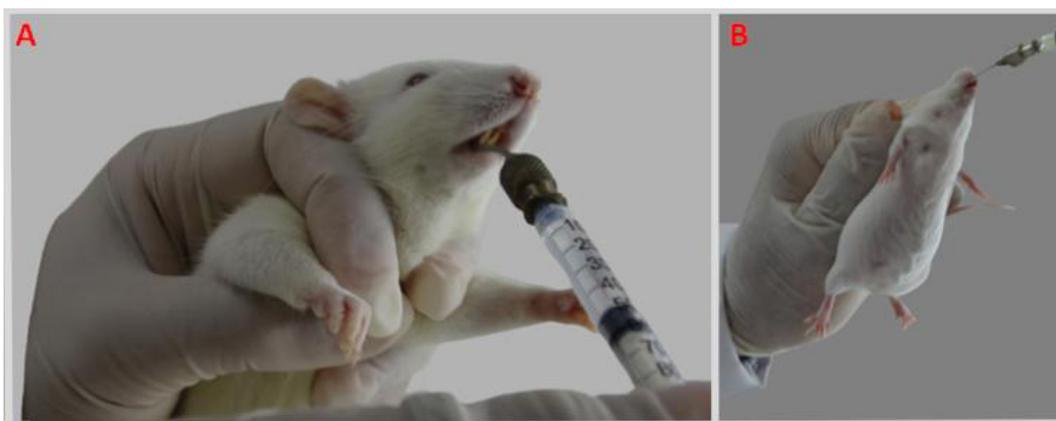


Figura 13: – Administração oral por gavagem em A: rato e em B: camundongo.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obtenção de uma amostra biológica de qualidade requer muitos cuidados, desde a experimentação *in vivo* até o manuseio durante os ensaios. Desta forma, é importante sempre discutir com os envolvidos na pesquisa e com o veterinário da instituição, a via de administração, bem como a técnica mais adequada para a coleta das amostras biológicas, de tal forma que se adequem aos principais objetivos do estudo. Outro ponto que deve ser destacado é o cuidado ético com os animais em experimentação: evitar causar dor, estresse e infecção ao animal, respeitando sua fisiologia no momento da coleta de sangue e administração de substâncias, garantindo todos os cuidados pré e pós-manuseio, somado ao aproveitamento máximo do animal, o que configura, desta forma, a incorporação do princípio dos 3Rs no estudo.

REFERÊNCIAS

BEETON, C.; GARCIA, A.; CHANDY, K. G. Drawing Blood from Rats through the Saphenous Vein and by Cardiac Puncture. **JoVE**. 7. 2007. Disponível em: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=266>, DOI: 10.3791/266.

BIOMETHODOLOGY for laboratory mice. Disponível em: http://www.theodora.com/rodent_laboratory/injections.html http://www.theodora.com/rodent_laboratory/blood_collection.html

BROWN, C. Blood collection from the tail of a rat. **Clinical Techniques**. v.35, n.8, 2006.

DIEHL, K.H. *et al.* A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. **Journal of Applied Toxicology**. v. 21, p.15-23, 2001.

The Animal Experiments Inspectorate. Guidelines for taking blood samples from mice and rats. Ministry of environment and food of Denmark. Danish veterinary and food administration. Disponível em: <https://www.foedevarestyrelsen.dk/SiteCollectionDocuments/Dyrevelfaerd%20og%20veterinaermedicin/Dyrevelf%C3%A6rd/Fors%C3%B8gsdyr/Dyrefors%C3%B8gstilsynet/Guidelines%20-%20engelsk/Guidelines%20for%20taking%20blood%20samples%20from%20mice%20and%20rats.pdf>. Acesso em: 06/04/2022; 17:35h.

HOFF, J. Methods of Blood Collection in the Mouse. **Lab Animal**. v. 29, n. 10, 2000.

KUMAR, M., DANDAPAT, S., SINHA, M.P., KUMAR, A., RAIPAT, B. S. Different blood collection methods from rats: A review. **Balneo Research Journal**. v. 8, n. 1, 2017.

MORTON, D.B. *et al.* Joint Working Group on Refinement. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. **Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals**, v. 35, p. 1-41, 2001.

NEVES, S.M.P. *et al.* **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. 2013.

PARASURAMAN, S.; RAVEENDRAN, R.; KESAVAN, R. Blood sample collection in small laboratory animals. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 1, n. 2, p. 87-93, 2010.

SHIMIZU, Shinya. Routes of Administration. In: Hedrich, Hans; Bullock, Gillian. **The Laboratory Mouse: The Handbook of Experimental Animals**. Copyright 2004 Elsevier. 632p. Chapter 32. p. 527-541. Disponível em: <file:///C:/Users/valer/Dropbox/RECIFE/UFPE/Escritas/Livro%20bio%C3%A9tica%20UFPE/Administra%C3%A7%C3%A3o/Shimizu,%202004-Cap%2032%20-%20Routeadministration%20-%20ISBN%200-1233-6425-6.pdf>. Acesso em: 06/04/2022; 18:56h.

TURNER, P.V. *et al.* Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v. 50, n.5. 2011.

CAPÍTULO 9

MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE MAMÍFEROS EM PESQUISA EXPERIMENTAL

Data de aceite: 01/03/2022

Samara Rodrigues Bonfim Damasceno Oliveira
Prof.^a Dr.^a Centro Universitário Estácio Recife

A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL EM DADOS NUMÉRICOS

Os animais têm sido usados no ensino e pesquisa por milênios na história da humanidade. Evidências mostram que, mesmo na Grécia Antiga, Aristóteles usava animais em seus estudos, principalmente para avançar na compreensão dos animais vivos nas áreas de ciências naturais. Mas foi apenas durante os séculos XVIII e XIX, que o desenvolvimento de modelos animais se expandiu com cientistas, como Jean Baptiste Van Helmont, Francesco Redi, John Needham, Lazzaro Spallanzani, Lavoisier e Pasteur conduzindo experimentos em animais para estudar a origem da vida.

Contudo, atualmente a realização dos estudos baseados em animais está sob crescente escrutínio, por razões científicas e éticas, dentre as quais têm chamado atenção o número alarmante de animais que têm sido utilizados. Cerca de 50-100 milhões de animais, desde peixes-zebra a primatas não humanos são usados para experimentação científica todos os anos. Embora os experimentos com vertebrados sejam regulamentados na maioria dos países, aqueles com invertebrados não são e, portanto, faltam estatísticas de uso precisas. O número total de animais usados somente nos EUA, em 2010, foi de quase 1,37 milhão, no qual, a maioria dos procedimentos foi realizada em camundongos e ratos (96%), além de outros animais, como cobaias, coelhos e hamsters. No Reino Unido, mais de três milhões de animais foram usados em 2011, que incluíam principalmente camundongos (71%), peixes (15%),

ratos (7%) e pássaros (4%).

Estatísticas semelhantes para o uso extensivo de animais na União Europeia também estão disponíveis. Aproximadamente 200 mil peixes e 20 mil anfíbios foram usados no Reino Unido em 2004, predominantemente peixes-zebra e a rã africana, *Xenopus laevis*. Mais de 20 mil coelhos foram usados para testes de irritação ocular (teste de Draize) no Reino Unido em 2004. Os efeitos biológicos no olho são mais fáceis de visualizar devido ao menor fluxo lacrimal e à ausência de pigmento ocular nesses animais. Os coelhos também são frequentemente usados para a produção de anticorpos policlonais. Embora a maioria dos animais mencionados acima também seja usada na Índia, o uso de sapos nesse país precisa de permissão especial do respectivo guarda-florestal estadual, uma vez que os sapos são rotulados, como espécies ameaçadas de extinção. As rãs estão incluídas no Anexo IV da Lei de Proteção à Vida Selvagem de 1972, da Índia, bem como na lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais. Animais maiores, como cães, gatos e primatas não humanos juntos representam menos de 1% dos animais usados em pesquisas a cada ano no mundo. Eles são comumente usados, como modelos para doenças humanas em cardiologia, endocrinologia, estudos ósseos e articulares. Os gatos são mais comumente usados em pesquisas neurológicas.

Em 2008, um grupo de pesquisadores do Reino Unido realizou um estudo sobre as estimativas para o uso mundial de animais de laboratório relacionadas ao ano de 2005. Nessa pesquisa, foram analisados 179 países e o número estimado de animais utilizados somente naquele ano foi de 58.339.972, incluindo vertebrados e espécies de invertebrados, como cefalópodes. Se fossem incluídos os animais mortos para suprimento

de tecido, usados para manter as colônias geneticamente modificadas e o excedente reproduzido, o número aumentaria para mais de 115 milhões.

Em 2019, Taylor e Alvarez atualizaram o estudo realizado sobre a estimativa mundial do uso de animais que o grupo já havia analisado em 2005. Nessa versão mais atualizada da pesquisa, referente ao ano de 2015, o grupo aplicou um modelo de previsão baseado em taxas de publicação, para estimar o uso de animais dos mesmos 179 países analisados anteriormente. Isso gerou uma estimativa do uso global de animais em procedimentos científicos de 79,9 milhões, um aumento de 36,9% sobre o valor estimado equivalente para 2005 que na época apresentou valores de 58,3 milhões de animais. Os cientistas extrapolaram ainda mais essa estimativa para obter um valor global final mais abrangente para o número de animais usados para fins científicos, o que levou esse número para valores ainda mais altos, na faixa de 192,1 milhões, nesse caso foram incluídos animais mortos com o objetivo de fornecer tecidos para uso *ex vivo* ou *in vitro*; animais geneticamente modificados (GM) ou sem modificação genética que são usados para manter colônias GM estabelecidas; e animais sem modificação genética criados para uso em laboratório, mas não usados. Dentre todos os países analisados, o Brasil, ao mesmo tempo em que se destaca como um dos 10 países com maior quantidade de publicações do ano de 2015, também chama a atenção por estar na oitava posição em maior quantidade de uso de animais de experimentação, perdendo apenas para China, Japão, Estados Unidos da América (USA), Canadá, Austrália, Coreia do Sul e Reino Unido. O gráfico apresentado na figura 01 mostra essa escala em dados numéricos.

O grupo mencionou, dentre as suas conclusões, que desde o estudo de 2005, não houve aumento evidente na quantidade de países que publicam dados sobre o número de animais usados em experimentos. Assim, sem estatísticas regulares e precisas, o impacto dos esforços para substituir, reduzir e refinar os experimentos com animais não pode ser monitorado de forma eficaz.

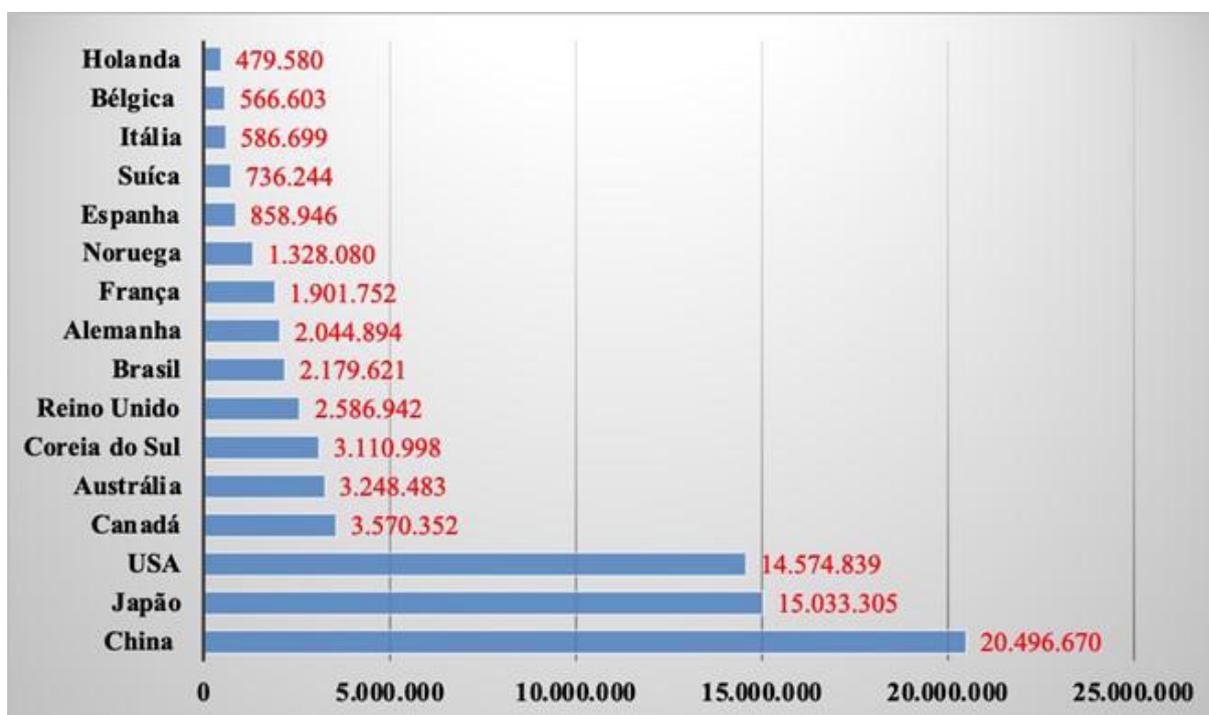


Figura 1 - Os principais países usuários de animais com base em números estimados do ano de 2015¹

Fonte: Adaptado de Taylor e Alvarez (2019).

¹ Os valores representam o número de procedimentos realizados com animais no ano de 2015. Os dados numéricos foram ajustados de acordo com as definições da União Europeia e os valores estimados foram derivados do modelo estatístico de cada estudo.

OS 3 RS

Os três Rs foram princípios propostos originalmente pelos estudiosos Russel e Burch da Federação de Universidades para o Bem-Estar Animal, os quais foram definidos como Substituição, Redução e Refinamento. A substituição envolve a adoção de alternativas aos animais protegidos, como o remanejamento para espécies não protegidas ou formas imaturas; linhagens celulares ou tecidos cultivados; modelagem matemática ou o uso de tecidos ou células humanas (com permissão), entre outras. A redução diz respeito a minimizar o número de animais usados para atingir efetivamente os objetivos de um experimento. O refinamento envolve a redução da capacidade de invasão de uma técnica ou a melhoria do bem-estar e da saúde animal durante os estudos científicos.

A ordem descrita por Russel e Burch (1959) sugere a preferência em que esses preceitos devem ser seguidos, onde a primeira prerrogativa é que animais sencientes não devem ser usados, se alternativas não sencientes estiverem disponíveis. Se o princípio da substituição não puder ser aplicado e os animais tiverem que ser usados, então entra em ação o princípio da redução, no qual o design e a análise do projeto devem ser tais que o número mínimo de animais sencientes seja usado compatível com o alcance dos objetivos da pesquisa. E em todas as situações envolvendo o uso de animais, o princípio do refinamento é essencial, onde devem ser tomadas medidas apropriadas para mitigar qualquer sofrimento ou angústia que os animais possam sentir.

Considerando a prerrogativa dos 3 Rs, parte considerável das preocupações que levam a restrições e maiores escrutínios de cientistas que fazem uso da experimentação animal residem no fato de ainda ser necessário utilizar animais sencientes nas pesquisas. Dessa forma, tentativas de substituição de animais de experimentação por medidas alternativas, com validação científica mundial, têm surgido e se tornado cada vez mais presentes na pesquisa básica.

MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE MAMÍFEROS EM PESQUISA CIENTÍFICA

O uso de animais em diversos estudos permanece inaceitável para algumas pessoas devido à constante preocupação com o bem-estar animal. A maioria dos cientistas e alguns membros do público em geral, no entanto, concordam que os testes em animais devem ser permitidos onde não houver alternativas viáveis, e desde que sejam realizados sob regulamentos estritos. Para tanto, acredita-se que é útil investigar os mecanismos subjacentes às doenças, validar novos medicamentos e fornecer informações sobre a toxicidade e as interações dos medicamentos.

De uma forma geral, há um consenso relacionado à tentativa de minimização do número de animais empregados para tais investigações científicas. Dessa maneira, alguns autores sugerem a utilização de técnicas alternativas aos testes em mamíferos, baseado no princípio da senciência, a qual apresenta evidências de que essa classe de animais teria alta capacidade de reconhecimento de sensações dolorosas e desconfortos advindos da prática experimental. Alguns desses métodos alternativos são detalhados abaixo e incluem simulações de computador e modelos matemáticos; testes *in vitro* (tecidos e células); estudos com modelos de células 3D e sistemas microfluídicos, bem como o uso de organismos inferiores que não são classificados como animais protegidos.

Simulação *in silico* e informática

A expressão *in silico* é geralmente usada para referir-se à experimentação realizada por computador e está relacionada aos termos biológicos mais comumente conhecidos *in vivo* e *in vitro*. Estas simulações computacionais podem reduzir o número de experimentos necessários, embora as simulações não possam substituir completamente os experimentos porque todos os princípios que governam um sistema geralmente não são conhecidos e as simulações usam aproximações em algum nível de detalhe devido à limitação do computador e da vida humana. Embora não sejam determinísticas, a simulação e a informática estão se tornando essenciais

em todos os campos da pesquisa científica para fazer uso eficiente do conhecimento existente no projeto de experimentos. Modelos de computador foram construídos para modelar o metabolismo humano, para estudar o acúmulo de placa de ateroma e risco cardiovascular, e para avaliar a toxicidade de drogas, tarefas para as quais os animais também são usados. Perfis de toxicidade e absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de poluentes ambientais e cosméticos podem ser previstos usando ferramentas computacionais para modelagem biocinética de base fisiológica. De maneira semelhante, as proteínas, receptores, célula de bicamada lipídica, cérebro, dentre outras estruturas, são frequentemente simulados, em várias escalas de detalhes, a fim de prever seu comportamento ou resposta a condições físicas e/ou estimulação química.

Com o passar dos anos, a simulação computacional e métodos de informática (Figura 2) têm minimizado o número de animais utilizados na descoberta de drogas, reduzindo as moléculas candidatas a fármacos em potencial. Da mesma forma, também tem reduzido o número de experimentos com animais exigidos nas ciências biológicas básicas pelo uso eficiente do conhecimento existente. Além disso, modelos computadorizados de anatomia, em 3D de alta definição, têm sido desenvolvidos para nivelar os detalhes que podem substituir a dissecação de animais para o ensino de anatomia.

Os modelos matemáticos podem contribuir para o trabalho experimental, através da definição de variáveis e testando teorias, reduzindo o custo desses experimentos e os tornando mais eficazes, como no caso da predição da estrutura de proteínas, que poderiam prever suas propriedades físicas e químicas. Vários tipos de testes científicos podem também ser beneficiados por esses estudos, todavia, apesar de contribuir para a diminuição do número de animais utilizados, essa metodologia não dispensaria o teste final em animais ou substituto biológico (ovos fertilizados de galinha ou cultura de células, por exemplo). Nesse contexto, é sempre importante lembrar que computadores processam e armazenam conhecimentos já existentes e muitos deles foram adquiridos com a utilização de animais na pesquisa.



Figura 02 - Demonstração de simulação *in silico*

Fonte: <https://www.istockphoto.com/br>.

Culturas de células e tecido

A prática de cultura de células e tecidos é utilizada principalmente em pesquisa básica aplicada. Essas técnicas são utilizadas em larga escala, em estudos sobre a ação de quimioterápicos sobre a viabilidade de células cancerígenas, e dessa forma, esses experimentos são a base para saber se uma droga tem o potencial de cessar a proliferação desordenada de células cancerígenas. Além disso, também podem ser realizados em cultivo de células, alguns testes de toxicidade de algumas substâncias, com tais ensaios fornecendo suporte, por exemplo, para ampliar o conhecimento sobre a potencialidade de uma droga ou substância recém-descoberta ser tóxica para células de nosso organismo. Assim, células em cultura são fáceis de serem manipuladas e observadas do ponto de vista microscópico, bioquímico e molecular, após a adição de substâncias no meio onde estão sendo cultivadas (Figura 3). Entretanto, é necessário que essa mesma substância testada nas células seja estudada quando aplicada em um organismo vivo (em animais de experimentação), pois para a concretização de muitas análises experimentais, a resposta sistêmica avaliada em um organismo vivo pode apresentar vários fatores do próprio organismo que podem se tornar interferentes nos resultados.

De qualquer maneira, os estudos prévios *in vitro* auxiliam na redução do número de animais utilizados nas pesquisas. Um exemplo concreto da utilização prática de cultura de células na ciência é relacionado à pesquisa utilizando a glândula hipófise (pituitária) humana. Essas glândulas, as quais eram provenientes de doadores cadáveres, eram utilizadas para extração do hormônio do crescimento para ser oferecido no tratamento de crianças com deficiência na produção desse hormônio. Após a constatação de contaminação de algumas crianças com doenças infecciosas provenientes do doador, essa prática caiu em desuso. A bioengenharia utilizando a bactéria *Escherichia coli* tornou a produção desse hormônio mais eficiente sem o risco de contaminações. Outro exemplo são os tecidos coletados de biópsias de mama, os quais podem ser utilizados, por exemplo, para estudar o desenvolvimento de câncer nesse órgão. Além disso, células derivadas de tecidos de outros órgãos podem ser utilizadas para os mais diferentes propósitos científicos.



Figura 3 – Demonstração de cultivo celular

Fonte: <https://www.istockphoto.com/br>.

Modelos microfluídicos (órgãos em chips) e cultura de células 3D

Com o avançar da ciência e tecnologia, alguns modelos de tecidos foram construídos usando cultura de células tridimensionais (3D), bem como alguns chips contendo modelos de órgãos. Geralmente, esses modelos são construídos com a ajuda de células humanas, o que minimiza a necessidade do uso animal, além de funcionarem como excelentes estratégias de compreensão do que acontece nas células humanas em condições fisiológicas e patológicas. Esses modelos também fornecem melhor controle sobre as condições investigativas, bem como experimentação mais rápida e conveniente e vão além das alternativas à experimentação animal, uma vez que esta tecnologia em combinação com as células-tronco pluripotentes induzidas emergentes (IPSC) está se movendo no sentido de fazer órgãos e tecidos implantáveis. Modelos de sistemas de múltiplos órgãos englobando coração, músculo, pele, cérebro, testículos, medula, intestino, rim, pulmões, fígado, bem como órgãos individuais, foram feitos em canais microfluídicos, juntamente com a recriação de microambientes físicos e químicos relevantes. Essas técnicas também chamadas de sistemas biomédicos ou biológicos microeletromecânicos (Bio-MEMS) ou *lab-on-a-chip* (LOC) (Figura 4) e sistemas de análise micro total apresentam grande potencial de substituição de muitos testes em animais em laboratórios comerciais no setor farmacêutico, indústrias de biotecnologia, química e segurança ambiental.

Dentre os sistemas microfisiológicos existentes, os que são caracterizados pelo cultivo de tecidos humanos organizados em histoarquitetura tridimensional em dispositivos microfluídicos foram recentemente introduzidos, como sendo os mais promissores. Fatores solúveis, gradientes, concentração de gás, fluxo de fluido, composição da matriz extracelular, propriedades mecânicas e geometria são alguns dos parâmetros que a tecnologia microfluídica permite controlar de forma mais precisa. Os modelos microfluídicos, dentre todas as suas potencialidades de aplicação, representam um passo importante para a recapitulação de um ambiente de ferida de pele que se assemelha à situação *in vivo*. Recentemente, um sistema *lab-on-a-chip* capaz de induzir mecanicamente áreas livres de células circulares, dentro de camadas de células confluentes em um ambiente microfluídico, foi desenvolvido para permitir a indução automatizada, miniaturizada e integrada de feridas definidas. Aspectos investigados, usando dispositivos microfluídicos, incluem o controle de infecção de biofilme para feridas crônicas, uma investigação quantitativa de migração e proliferação celular, migração de células de músculo liso vascular, interações célula-célula e célula-matriz extracelular, migração de células endoteliais ou germinação na presença de gradientes de fator de crescimento e tensão de cisalhamento.

Nesse contexto de avanço biotecnológico, as células cultivadas em formato tridimensional, conhecidas como cultura de células 3D, permitem um crescimento de células em agregados 3D ou esferoides usando um andaime, matriz ou de forma livre de andaime. A condição de cultura 3D pode ser modificada para incluir fatores ou proteínas encontrados em determinado tecido ou microambiente tumoral. As matrizes contêm componentes da matriz extracelular que levam ao aumento do contato célula-célula, comunicação e ativação da via de sinalização, de modo que a diferenciação funcional e morfológica da célula pode ser amplamente restaurada para o que é visto *in vivo*. Assim, os níveis de expressão de genes e proteínas nessas células e, portanto, os comportamentos celulares são semelhantes aos níveis *in vivo*. Portanto, o conjunto dessas características encontradas nesse modelo de investigação científica preenche diversas lacunas existentes entre a triagem de drogas *in vitro* e *in vivo*, possivelmente diminuindo o uso de modelos animais.

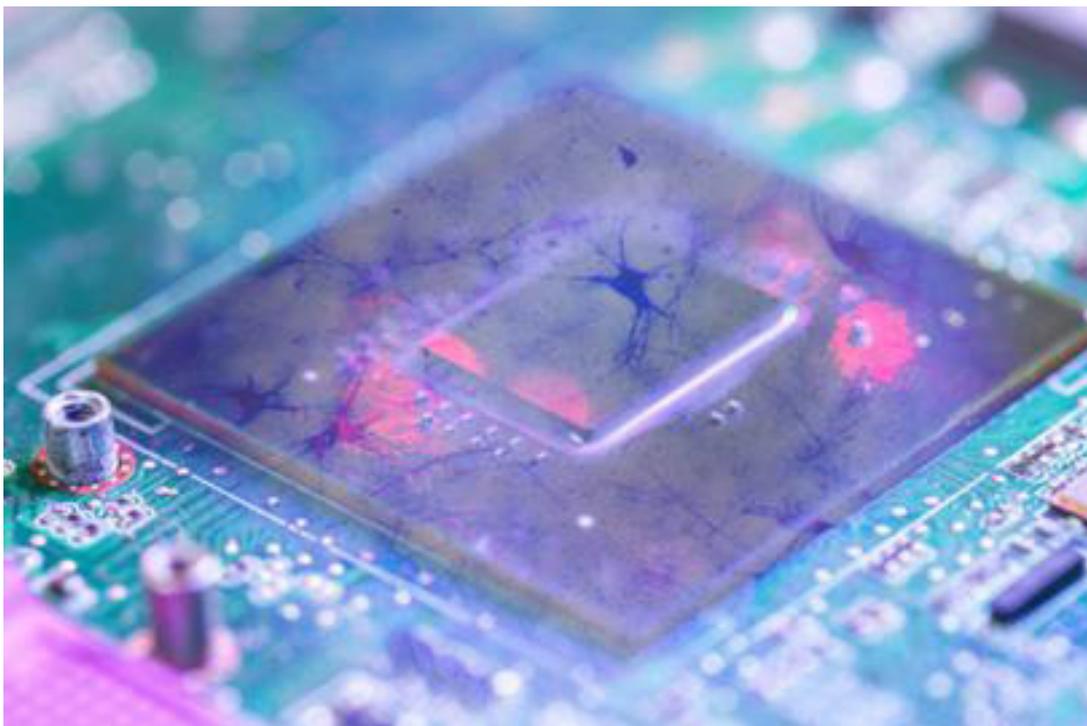


Figura 04 – Órgão em chip (neurônio com Chip de CPU com pouca luz)

Fonte: <https://www.istockphoto.com/br>

Peixe-Zebra (*Zebrafish*)

Apesar do grande número de métodos alternativos disponíveis, o uso de vertebrados ainda é imprescindível para algumas áreas da ciência devido à sua elevada complexidade biológica e semelhança com os humanos. A utilização do zebrafish (*Danio rerio*) como modelo experimental tem crescido rapidamente para a pesquisa biomédica. Pesquisadores do mundo todo estão se interessando cada vez mais por esse pequeno peixe tropical de água doce e uma das razões mais difundidas é que os embriões dessa espécie, ao contrário dos de camundongos, se desenvolvem fora do organismo materno e são transparentes. Essa é uma grande vantagem que permite aos pesquisadores estudar detalhadamente o desenvolvimento embrionário dos vertebrados, sem a necessidade de procedimentos invasivos. Outro fator benéfico é que o zebrafish pode produzir de 200 a 300 ovos fertilizados por semana e completa sua embriogênese em 72h. E ainda, os adultos e os embriões dessa espécie são de tamanho pequeno, tem menor custo e o intervalo entre gerações é curto.

O pequeno peixe de água doce *Danio rerio*, conhecido como peixe-zebra devido à coloração do seu tegumento (Figura 5), é comumente usado para pesquisas básicas e estudos de modelos de doenças. Vários recursos tornam o peixe-zebra um sistema de pesquisa valioso, pela sua semelhança do genoma com humanos, fácil manipulação genética, transparência embrionária, rápido desenvolvimento embrionário e grande número de descendentes. Outra vantagem é o menor desenvolvimento neurológico em comparação aos mamíferos, provavelmente implicando redução na percepção da dor e suscetibilidade ao estresse. O peixe-zebra é usado como um sistema modelo para biologia e patologia da pele, pois possui uma pele composta por uma epiderme e uma derme colágena, separadas por uma membrana basal. O peixe-zebra é usado para estudos de cicatrização de feridas, pois os principais eventos encontrados no reparo da pele de mamíferos estão presentes, embora o ambiente líquido circundante represente uma grande diferença objetiva para os humanos. O peixe-zebra é amplamente utilizado também em estudos relacionados à melanogênese, distúrbios de pigmentação e melanoma.



Figura 5 - Peixe-Zebra (*Danio rerio*)

Fonte: <https://www.istockphoto.com/br>.

Na verdade, células de pigmento preto originadas da crista neural (melanóforos) estão presentes na derme e se comportam de forma semelhante aos melanócitos humanos. Quanto aos estudos de melanoma, peixes-zebra geneticamente modificados expressando oncogenes de melanoma recapitulam a gênese e o desenvolvimento do melanoma. As doenças de pele hereditárias que afetam a adesão celular e os distúrbios de queratinização também foram reproduzidos no peixe-zebra. As limitações no uso do peixe-zebra como modelo animal de pele incluem a falta de uma barreira epidérmica e de apêndices, e a presença de escamas nos peixes adultos. No entanto, a falta de barreira epidérmica permite a triagem sistêmica de drogas, simplesmente adicionando compostos à água.

Drosophila

Apesar de estar tão distante dos humanos filogeneticamente, a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (Figura 06) é usada como modelo animal para elucidar as redes moleculares subjacentes à fisiologia da pele. A *D. melanogaster* possui epiderme de camada única e tem sido amplamente utilizada para estudos de fechamento de feridas. De fato, vários *insights* sobre os mecanismos moleculares subjacentes ao comportamento das células epiteliais no reparo da pele foram obtidos usando o modelo de fechamento dorsal larval de *D. melanogaster*.

Outros campos dermatológicos que usam modelos de mosca da fruta são o envelhecimento e distúrbios imunológicos. Além disso, a *D. melanogaster* também tem sido usada para identificar mecanismos moleculares subjacentes a doenças de pele genéticas humanas. Os modelos de *D. melanogaster* são convenientes por serem geneticamente tratáveis e, devido ao grande número de descendentes gerados, permitem análises de alto rendimento. No entanto, a transferência de resultados para doenças dermatológicas humanas é limitada pelas diferenças estruturais e fisiológicas da pele humana.



Figura 6 – Mosca-das-frutas macho (*Drosophila melanogaster*)

Fonte: <https://www.istockphoto.com/br>

Microrganismos

Alguns micro-organismos, como bactérias (Figura 7) e leveduras, são aceitos como modelos para investigação de fatores associados ao metabolismo, à genética e à bioquímica. Como uma das práticas mais comuns relacionadas a esse recurso, encontram-se os estudos associados aos fundamentos dos mecanismos de expressão gênica desses organismos, os quais são aplicáveis para a compreensão do desenvolvimento saudável e patológico de embriões humanos. Dentre as justificativas para o uso desses modelos como possíveis alternativas de substituição do uso animal na pesquisa científica, existem alguns estudos mostrando que algumas semelhanças são preservadas entre esses micro-organismos e mamíferos, como, por exemplo, as leveduras que possuem receptores de estrogênio, os quais apresentam afinidade idêntica aos encontrados em útero de ratas, e dados como estes reforçam a validade científica do uso desses seres, como modelos de pesquisa, que podem ser úteis na tentativa de minimizar o número de animais protegidos em testes de laboratório, apesar de não substituírem totalmente os mamíferos por diversos outros fatores inerentes à diferença fisiológica entre tais espécies.

Outro exemplo de micro-organismos utilizado atualmente em investigações científicas são os vírus, os quais podem ser empregados em benefício da saúde humana e de forma indireta minimizar o uso de animais de laboratório, em termos de quantidade, pelo fato de possibilitar, através do seu estudo, a aplicação de metodologias modernas, como a tecnologia do DNA recombinante e, dessa forma, tornar mais concretas e objetivas algumas pesquisas, diminuindo a necessidade de rastreios farmacológicos que costuma usar uma quantidade muito alta de animais na pesquisa básica. Nesse contexto, a terapia gênica tem utilizado algumas espécies de vírus, como veículos para transportar genes normais para células de tecidos acometidos por doenças genéticas, então quando o vírus (modificado para que não cause doença) infecta a célula hospedeira, ele transfere o gene que os pesquisadores inseriram no seu genoma, fazendo com que a célula do hospedeiro expresse o gene de interesse. O desenvolvimento de tecnologias como essa tem aperfeiçoado cada vez mais o poder investigativo de muitos pesquisadores ao redor do mundo, sem a necessidade de uso de quantidades alarmantes de animais para isso.



Figura 7 – Cultura de bactérias aeróbias na placa de ágar

Fonte: <https://www.istockphoto.com/br>.

A figura 8 traz uma comparação dos pontos fortes e fracos dos modelos experimentais citados no presente capítulo, usando uma escala relativa, com informações acerca de complexidade, limitações experimentais, potencial para manipulação, isolamento de variáveis, compreensão mecânica e valor terapêutico.

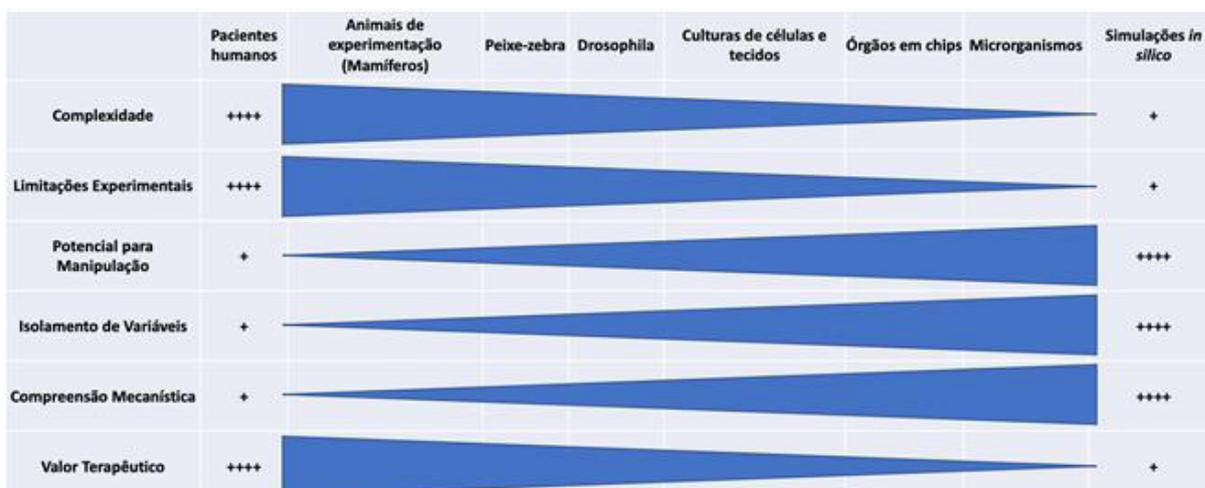


Figura 8 - Comparação dos pontos fortes e fracos dos modelos experimentais disponíveis usando uma escala relativa

Fonte: Elaborado pela autora.

POR QUE O USO DE ANIMAIS EM PESQUISA AINDA SE FAZ NECESSÁRIO?

Desde 1901, dois terços dos ganhadores do Nobel de Fisiologia ou Medicina confiaram em dados de animais para suas pesquisas. Ratos, camundongos e outros roedores representam 95% de todos os animais usados e os primatas não humanos representam 0,33%. Ao lado da constituição genética, existem muitas semelhanças anatômicas entre esses animais e o ser humano, pois eles possuem um mesmo conjunto de órgãos como coração, fígado, rins, pulmão e outros tecidos. Além de possuírem o mecanismo interno do corpo e fisiologia semelhantes, como sistema circulatório, respiratório, nervoso, endócrino, dentre outros. Portanto, essas semelhanças tornam algumas espécies animais propensas ao uso em laboratório.

Nos séculos XIX e XX, as maiores descobertas de drogas só foram possíveis devido ao uso de animais. Ao longo do último século, todo Prêmio Nobel de pesquisa médica dependeu da pesquisa animal. O primeiro Prêmio Nobel em 1901 em Medicina foi para soroterapia e pesquisas envolvendo o uso de cavalos. Na década de 1880, Behring usou cavalos para a produção de antitoxina diftérica e para o desenvolvimento de uma vacina contra a difteria e o tétano, ganhando o primeiro prêmio Nobel de fisiologia ou medicina em 1901. A insulina foi isolada pela primeira vez em cães em 1922 e revolucionou o tratamento do diabetes. Na década de 1970, o tratamento com antibióticos e vacinas para a hanseníase foi desenvolvido com tatus. Domagk introduziu a atividade antibacteriana do prontossil em 1939, por meio de experimentos com frango. Os mais recentes ganhadores do Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2020 também trabalharam com animais, especificamente com chimpanzés, na pesquisa relacionada à descoberta do vírus da Hepatite C.

Animais ainda são permitidos e necessários para triagem de drogas em bioensaios e para testes pré-clínicos, incluindo estudos de toxicidade gerais e específicos. Esses dados pré-clínicos de segurança e eficácia são necessários para o envio às autoridades regulatórias de medicamentos antes que a permissão para estudos adicionais em humanos seja concedida. Além disso, os animais têm sido considerados bons modelos para estudos das doenças humanas, bem como para a obtenção de conhecimentos biológicos básicos; a descoberta e desenvolvimento de medicamentos, vacinas e dispositivos médicos; nos testes de segurança de medicamentos, outros produtos químicos e de consumo; em pesquisa ambiental e na qualificação de pessoal de nível superior e mão de obra especializada para a realização de pesquisas.

As experimentações animais podem incluir pesquisa básica (por exemplo, comportamental, embriológica, fisiologia e genética) que é necessária para contribuir indiretamente para a remediação de doenças humanas e pesquisa aplicada (acadêmica e/ou comercial), como patologia, farmacologia, toxicologia, teste de drogas e pesquisa de patógenos. Um número maior e uma variedade maior de animais são usados na pesquisa básica do que na pesquisa aplicada, que geralmente envolve estudos sobre embriogênese, biologia do desenvolvimento, comportamento e reprodução em moscas-das-frutas, nematoides, camundongos e ratos. A pesquisa aplicada visa responder a questões específicas e é geralmente realizada na indústria farmacêutica ou por universidades. Modelos animais de doenças, descobertos ou gerados por programas de pesquisa básica, são usados para pesquisa aplicada. Os exemplos incluem o uso de animais transgênicos, modelos animais de doenças que ocorrem naturalmente, modelos animais induzidos de doenças humanas e estudos de toxicidade.

A pesquisa animal é, portanto, essencial para o avanço de novas tecnologias e medicamentos cruciais para melhorar a saúde humana e animal. Também é vital para a nossa compreensão da biologia animal e humana fundamental, bem como de áreas essenciais da ciência animal aplicada, como a forma como os animais funcionam em face das mudanças climáticas ou distúrbios antropogênicos. Além disso, estudos que exploram a saúde e o bem-estar animal nos permitem gerenciar os animais em cativeiro, de maneira mais eficaz e prevenir o mal-estar que leva às doenças.

Contudo, apesar da grande diversidade de motivos que tornam a pesquisa animal necessária, os cientistas são cada vez mais solicitados a justificar suas abordagens experimentais ao usar animais protegidos. Isso é parcialmente motivado por demandas do público em geral de que o uso de animais em pesquisas deve ser moral e eticamente justificável. Uma pesquisa recente nos EUA demonstrou que 50% do público se opôs ao uso de

animais em pesquisas. Em 2015, nove países europeus apresentaram uma petição à Comissão Europeia (CE) para proibir a pesquisa em animais. No entanto, a CE se opôs a esse movimento, mas respondeu afirmando que a justificativa ética e a adoção do Princípio dos 3Rs (Substituição, Redução e Refinamento) é uma obrigação para estudos experimentais. Obviamente, é do interesse dos cientistas adotar uma abordagem ética e humana para a criação e o projeto experimental, já que animais saudáveis produzem resultados robustos e confiáveis, subjacentes a produções científicas válidas. Por exemplo, a melhoria no manejo de roedores reduz o estresse, e isso leva a dados menos variáveis e resultados mais significativos. A incorporação do princípio dos 3Rs no planejamento e execução científicos, portanto, beneficia diretamente a qualidade dos dados.

O PRINCÍPIO DA SENCIENTIA ANIMAL VERSUS USO DE MAMÍFEROS NA PESQUISA

O uso de animais não humanos como modelos em pesquisas e testes de fármacos é uma prática fundamental pela qual o conhecimento científico contemporâneo é certificado. A pesquisa com animais representa o principal método de investigação científica requerido. Por exemplo, Rupke (1987) argumenta que a vivisseção foi imprescindível para a medicina se transformar de uma arte em uma ciência, porque fazer uso dessa prática significava utilizar o método experimental.

A incongruência central da pesquisa animal é que animais não humanos são usados como modelos, porque são vistos como carentes de certas capacidades conscientes, contudo são usados exatamente por causa de suas semelhanças biológicas com os humanos, dentre as quais está a sua capacidade de sentir. Esta incoerência é refletida no princípio dos 3Rs, no qual a ideia de substituir, reduzir e refinar o uso de animais em pesquisa repousa em uma compreensão particular de senciência.

A definição de senciência é a capacidade de perceber pelos sentidos, uma capacidade de sentir ou experimentar subjetivamente, baseado no princípio de que o animal deve estar consciente para que algo seja percebido ou experimentado. Isso significa que o animal está ciente das sensações, sentimentos, emoções e outras saídas subjetivas do processamento neural de entradas sensoriais geradas tanto de dentro, quanto de fora do corpo. Por esta definição, portanto, os animais que são sencientes devem possuir a capacidade de serem conscientes.

Pode-se inferir que um animal está consciente, quando exhibe flexibilidade comportamental, incluindo capacidades para direcionar a atenção para estímulos relevantes, para determinar respostas apropriadas à situação, sob novas condições e para se envolver em comportamentos volitivos direcionados a objetivos.

Ter a capacidade de sentir dor é suficiente para a senciência. As evidências disponíveis apoiam a tese de que mamíferos e pássaros são seres caracteristicamente sencientes, embora também haja fortes evidências de senciência da maioria das espécies de vertebrados e, entre os invertebrados, pelo menos os cefalópodes. Assim, partindo do princípio da senciência animal, atualmente há um questionamento sobre o fato desse aumento aparentemente muito significativo no uso de animais de laboratório em todo o mundo realmente ser necessário, surgindo assim motivações éticas voltadas para uma busca constante de substituição dessa prática a partir da exploração de novas possibilidades na ciência experimental.

ADVENTO DE MÉTODOS NÃO ANIMAIS NO BRASIL

Em 2008, após a introdução da Lei Arouca, grande esforço tem sido feito no Brasil para reforçar a importância do bem-estar animal e a promoção do princípio dos Três R's. A primeira chamada (nº 25/2012) de propostas de bolsas específicas para métodos alternativos no Brasil foi realizada em 2012 pelo então Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), hoje Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para apoiar projetos relacionados à estruturação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama), a qual foi criada ainda em 2012 pelo MCTI, com o objetivo de otimizar o uso dos recursos públicos na ciência e promover o desenvolvimento, implementação e aceitação de métodos alternativos no Brasil. Nessa chamada, foram

selecionados dez projetos que assentaram em alguma das seguintes áreas de investigação: (I) implementação de métodos alternativos já validados e reconhecidos internacionalmente; e (II) o desenvolvimento e validação de um modelo de pele humana reconstituída pela *Organisation for the Economic Co-operation and Development Test Guideline* (OECD, TG 439), na forma de um kit, para testes de segurança e eficácia. Nessa época, o Brasil conquistou reconhecimento internacional por seu trabalho na formação e treinamento de pesquisadores no desenvolvimento e/ou implantação de métodos substitutivos, tendo sido reconhecido pelo prêmio global Lush Prize, criado em 2012 pela empresa britânica de cosméticos Lush, e pela organização não governamental *Ethical Consumer Research Association*.

Em 2016, o MCTIC implantou a Plataforma Regional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais (PReMASUR), composta pelos países do Mercosul, a qual visa estabelecer uma infraestrutura laboratorial e prover recursos humanos especializados para promover métodos alternativos no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. Laboratórios com experiência em métodos alternativos, incluindo aqueles associados à Renama, realizam sessões anuais de treinamento teórico/prático em diferentes métodos *in vitro*, cobrindo vários parâmetros toxicológicos.

Embora tenha havido muitos avanços, o progresso em alternativas que não sejam animais ainda é restrito, dificultando o uso generalizado de muitas práticas livres de animais em Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I). Além disso, a pesquisa no Brasil é cara, muitos materiais de laboratório usados em PD&I são importados e, após os custos de transporte, desembaraço aduaneiro e tarifas brasileiras, seu custo original é, pelo menos, triplicado. O tempo necessário para a liberação dos trâmites aduaneiros burocráticos representa outro obstáculo, impossibilitando a importação de produtos de origem humana (tecidos e células) em um prazo viável (em média 3 dias). Por exemplo, modelos reconstruídos de tecidos vivos (como pele, córnea, membranas mucosas etc.) os quais são comercializados em vários países, não poderiam ser solicitados e tê-los entregues e disponíveis para uso no Brasil, dentro do prazo de validade, o que atrasa a pesquisa e a inovação e leva ao aumento dos custos.

Apesar das dificuldades, podem-se mencionar alguns avanços, como o fato do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) ter publicado, em 2018, a Resolução nº 38/2018, a qual prevê restrições ao uso de animais na educação e afirma que é proibida a utilização de animais em atividades didáticas demonstrativas e observacionais que não visem o desenvolvimento psicomotor e outras habilidades dos alunos envolvido. A resolução proíbe a morte de animais para dissecação anatômica e experimentos envolvendo o uso de animais vivos ou “preparações” clássicas feitas de tecidos de animais mortos recentemente. A referência à aquisição de habilidades significa que a proibição não se refere a aulas práticas para aquisição de habilidades clínicas e treinamento em cirurgia, nem qualquer treinamento na condução de experimentos com animais de laboratório para fins de pesquisa e teste. Também exclui estudos de pós-graduação e cursos vinculados à saúde e ao bem-estar dos animais de fazenda, relacionados à produção animal. A resolução exige a implementação de alternativas de substituição e afirma que, a partir de 2019, o uso de animais na educação deve ser totalmente substituído por vídeos, modelos de computador ou outros recursos com conteúdo e qualidade suficientes para manter ou melhorar as condições de aprendizagem.

EXEMPLOS DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS ATUALMENTE UTILIZADOS

Atualmente, há muitos testes em uso ou em etapas de verificação avançadas, na tentativa de substituição ao uso de animais em pesquisas focadas principalmente na avaliação toxicológica. Há alguns anos, os testes de irritabilidade de substâncias eram frequentemente realizados aplicando determinados produtos diretamente sobre a córnea de coelhos, os quais ficaram conhecidos como teste de irritação ocular de Draize. Vários testes foram desenvolvidos para substituir essa prática, tais como o teste do ovo de galinha ou teste da membrana corioalantóide, o qual utiliza ovos de galinha fertilizados para avaliar a irritabilidade da membrana corioalantóide, que possui uma grande quantidade de vasos sanguíneos, assim esses testes podem ser usados para classificar

o nível de irritação de uma substância-teste avaliando episódios hemorrágicos, de lise ou coagulação. Outro exemplo de substituição do ensaio de Draize é o teste de opacidade/permeabilidade da córnea bovina (OECD TG 437), no qual são testadas a opacidade (quantidade de transmissão de luz pela córnea) e permeabilidade (quantidade de passagem do corante de fluoresceína de sódio) de córneas providas de olhos de bovinos recém-abatidos obtidos em um matadouro local. Olhos de galinha (OECD TG 438) e de coelho isolados de animais mortos (que seriam descartados), bem como o modelo de monocamada de células renais caninas Madin-Darby (OECD TG 460) são também utilizados como modelos para teste de irritação ocular.

Além disso, existem também modelos epiteliais 3D disponíveis comercialmente, como o EpiOcular™, que é um preparado com queratinócitos epidérmicos derivados da pele humana e o SkinEthic™ com células epiteliais da córnea humana imortalizadas (HCE), os quais foram desenvolvidos para testes de irritação de pele *in vitro* (OECD TG 492). Outra alternativa para o teste de irritação da pele de animais *in vivo* é o ensaio de captação de vermelho neutro (NRU), que representa um teste de viabilidade de queratinócitos humanos, que têm sido usados para prever toxicidade sistêmica aguda e predição de foto toxicidade aguda. O ensaio Corrositex™ (OECD TG 435) é um método *in vitro* também validado para avaliar o potencial corrosivo da pele, esse teste apresenta o potencial de substituir experimentos dolorosos com animais, medindo o tempo necessário para passar por uma barreira biológica, contendo corantes indicadores de pH (OECD, 2014). Como métodos de teste de irritação cutânea *in vitro*, muitos modelos de epitélio humano reconstruído (RhE) feitos de queratinócitos humanos primários não transformados estão sendo estudados (OECD TG 439), dentre eles podem-se citar como já validados o EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ RhE e LabCyte EPI MODEL (OECD, 2013) e o modelo Keraskin™ (Biosolution Co., Seul, Coreia do Sul) que tem se mostrado em estágio de pré-validação.

A penetração de produtos químicos, através do estrato córneo para os queratinócitos subjacentes pode causar lesão e induzir inflamação, dilatação das células endoteliais e subsequente irritação da pele, eritema e edema. Em 2016, Wufuer e colaboradores relataram o desenvolvimento da tecnologia *skin-on-a-chip* para testar a toxicidade cutânea de cosméticos ou medicamentos. O modelo de Wufuer e colaboradores consiste em células HaCaT, fibroblastos HS27 e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) como substitutos de células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais de vasos sanguíneos, respectivamente, e permite avaliar informações precisas sobre viabilidade celular e inflamação da pele, mensurando, inclusive, perfis de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e IL-8.

O celenterado de água doce *Hydra vulgaris* também representa uma alternativa de substituição ao uso de mamíferos em pesquisa científica, esta espécie apresenta potencial para uso em testes de toxicidade aguda, subaguda e crônica com desfechos de sobrevivência/mortalidade e mudanças morfológicas na estrutura.

Outra espécie animal menos evoluída que tem sido utilizada na tentativa de reduzir o número de mamíferos em testes de laboratório e que se tornou um importante modelo para estudar a biologia do desenvolvimento, desde a década de 1970, é a *Caenorhabditis elegans*, uma espécie de nematódeo da família Rhabditidae que mede cerca de 1 milímetro de comprimento, e vive em ambientes temperados. *C. elegans* trata-se de um organismo de teste toxicológico popular para vários desfechos de toxicidade, incluindo reprodução e dano/reparo de DNA. Uma forma de avaliar a interferência de determinadas substâncias testadas no desenvolvimento desses animais é analisando o número de ovos não eclodidos de *C. elegans* expostos a compostos, por exemplo.

Outro modelo bem conhecido, já utilizado há vários anos e que vem sendo cada vez mais aplicado atualmente é a espécie *Danio rerio*, conhecido pela terminologia inglesa *Zebrafish*, ou peixe-zebra em português. Trata-se de um peixe tropical teleósteo, da família dos Ciprinídeos. É um importante organismo modelo, frequentemente utilizado em pesquisas genéticas e análises voltadas para a biologia do desenvolvimento. Sua notável capacidade de regeneração tem sido importante para a criação de linhagens transgênicas. O embrião de peixe-zebra também surgiu como modelo alternativo, para monitorar a toxicidade do desenvolvimento, neurotoxicidade e toxicidade cardiovascular, além de estar sendo investigado atualmente em pesquisas envolvendo a busca de novas terapias para o câncer.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E O QUE SE ESPERA PARA O FUTURO

O uso de animais, tanto no ensino quanto na pesquisa, ainda gera muitas polêmicas. Ainda assim, não se pode negar que a obtenção de conhecimento, bem como várias substâncias essenciais à saúde humana, como medicamentos e vacinas foram e continuarão a ser desenvolvidas graças a esses experimentos. Embora vários métodos *in vitro* tenham sido sugeridos para minimizar o uso de modelos animais para testes de drogas e produtos químicos, eles têm várias limitações e desvantagens, como, por exemplo, a falta de metabolismo sistêmico em condições de cultura. Consequentemente, as reações de longo prazo e sistêmicas não podem ser simuladas *in vitro* devido à falta de interações entre os diferentes tipos de células. No entanto, apesar de não ser capaz de substituir totalmente o uso de animais de experimentação, tais testes têm sido propostos para reduzir o número de animais necessários e mitigar seu uso indiscriminado. As vantagens desses testes alternativos incluem experimentos rápidos, condições controladas, redução subsequente da variabilidade entre os testes e resultados relativos acurados associados às células de origem humana.

Dessa forma, é possível inferir que, na atual conjuntura, a total exclusão do uso de animais na pesquisa experimental ainda representa uma realidade difícil de ser alcançada, pois apesar de todas as novas possibilidades que têm surgido através de métodos alternativos, nenhuma dessas medidas apresenta-se eficaz na substituição total e completa do uso animal, sendo necessária ainda a utilização deles em pelo menos uma das fases da pesquisa. Assim, apesar do consenso de utilização de métodos alternativos ao uso animal sempre que possível, o mais sensato seria admitir que há métodos complementares, mas que as limitações das ferramentas atualmente disponíveis mostram que tais modelos ainda não podem ser considerados totalmente substitutivos, o que faz prevalecer a ideia de minimização, sempre que possível, da quantidade de animais utilizados em propósitos científicos, principalmente mamíferos e outras espécies com a percepção de sentiência mais aguçada, associando diferentes técnicas às alternativas já existentes, além da constante busca pelo refinamento das metodologias utilizadas, para que o desconforto animal seja reduzido ao mínimo.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M.F. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 91, supl. 1, e20170238, 2019.
- ANGELO C. Brazil freezes science spending. **Nature.**, v. 568, p. 155-156, 2019.
- ARORA, T. et al. Substitute of animals in drug research: an approach towards fulfillment of 4R's. **Indian J Pharm Sci.**, v. 73, p. 1-6, 2011.
- BEKOFF, M.; Are You Feeling What I'm Feeling? **New Scientist**, v. 123, p. 42-47, 2007.
- BENNETT, A. J.; RINGACH, D. L. Animal research in neuroscience: a duty to engage. **Neuron.**, v. 92, p. 653-657, 2016.
- DE ÁVILA, R. I.; VALADARES, M. C. Brazil Moves Toward the Replacement of Animal Experimentation. **Altern Lab Anim.**, v. 47, p. 71-81, 2019.
- DEMUYSER, L.; VAN DIJCK, P. Can *Saccharomyces cerevisiae* keep up as a model system in fungal azole susceptibility research? **Drug Resist Updat.**, v. 42, p. 22-34, 2019.
- DINESH K. B.; CHETNA D. Animal use in pharmacology education and research: The changing scenario. **Indian J Pharmacol.**, v. 46, p. 257-265, 2014.
- DE VECCHI, R.; DAKIC, V.; MATTOS, G. Implementation, availability and regulatory status of an OECD accepted reconstructed human epidermis model in Brazil. **Vigil Sanit Debate**, v. 6, p. 64-71, 2018.
- FAZIO, M. et al. Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. **Nat Rev Cancer**. v. 20, p. 263-273, 2020.

GIBBS, C. J. et al. Chemical and pathological features and laboratory confirmation of Creutzfeld-Jakob disease in a recipient of pituitary-derived human growth hormone. **N. Engl. J. Med.** v. 313, p. 731, 1985.

KEHINDE, E. O. They see a rat, we seek a cure for diseases: the current status of animal experimentation in medical practice. **Med Princ Pract.**, v. 22, p. 52-61, 2013.

KIRK, R.G.W. Recovering the principles of humane experimental technique: The 3Rs and the human essence of animal research. **Science, Technology and Human Values**, v. 43, p. 603-29, 2018.

LIEBSCH, M. et al. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. **Arch Toxicol.**, v. 85, p. 841-858, 2011.

MARIA GARCIA, R. C. et al. Brazil starts to ban animal use in higher education: A positive and progressive development. **Altern Lab Anim.**, v. 46, p. 235-239, 2018.

MELLOR, D.J. Galloping colts, fetal feelings and reassuring regulations: Putting animal welfare science into practice. **J. Vet. Med. Educ.**, v. 37, p. 94-102, 2010,

MELLOR, D. J.; LENTLE, R. G. Survival implications of the development of behavioural responsiveness and awareness in different groups of mammalian young. **N. Z. Vet. J.**, v. 63, p. 131-140, 2015.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. **Methuen & Co Ltd.**, London, UK: 1959.

ŠPINKA, M. Animal agency, animal awareness and animal welfare. **Anim. Welf.**, v. 28, p. 11-20, 2019.

SNEDDON, L. U.; HALSEY, L. G.; BURY, N. R. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. **J Exp Biol.**, v. 220, p. 3007-3016, 2017.

TAYLOR, K.; ALVAREZ, L. R. An Estimate of the Number of Animals Used for Scientific Purposes Worldwide in 2015. **Altern Lab Anim.**, v. 47, p. 196-213, 2019.

TAYLOR, K. et al. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. **Altern. Lab. Anim.**, v. 36, p. 327-342, 2008.

VANDEBRIEL, R. J.; VAN LOVEREN, H. Non-animal sensitization testing: State-of-the-art. **Cri Rev Toxicol.**; v. 40, p. 389-404, 2010.

WEARY, D.M.; DROEGE, P.; BRAITHWAITE, V.A. Behavioural evidence of felt emotions: Approaches, inferences and refinements. **Adv. Stud. Behav.**, v. 49, p. 27-48, 2017.

SOBRE OS ORGANIZADORES

EDITOR:

Eduardo Carvalho Lira

REVISÃO TÉCNICA:

Joel Majerowicz

AUTORES:

Glória Isolina Boente Pinto Duarte

José Jairo Teixeira da Silva

Eduardo Carvalho Lira

Dayane Aparecida Gomes

Leucio Duarte Vieira Filho

Valéria Nunes de Souza

Ismaela Maria Ferreira de Melo

Samara Rodrigues Bonfim Damasceno Oliveira

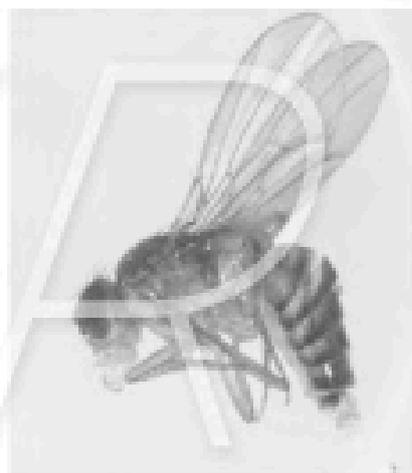
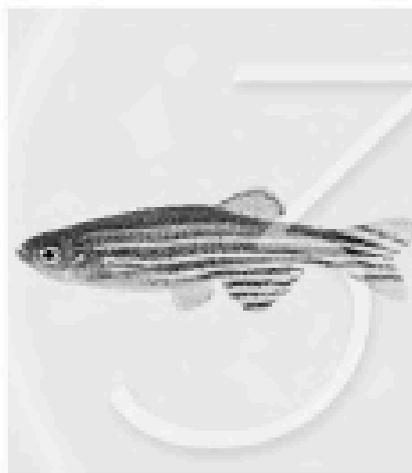
BIOÉTICA E MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 



BIOÉTICA E MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 

