

ASPECTOS FUNDAMENTAIS DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - APLICAÇÕES EM CIRURGIA EXPERIMENTAL

SUELI BLANES DAMY^{1*}, ROBERTO SOUZA CAMARGO², ROBER CHAMMAS³, LUIZ FRANCISCO POLI DE FIGUEIREDO⁴

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, S.Paulo, SP

RESUMO

Com o objetivo de contribuir à pesquisa em cirurgia experimental, este artigo apresenta uma análise dos principais parâmetros exigidos a serem observados pelos comitês internacionais e nacionais de ética e bem-estar animal, cujo cumprimento é pré-requisito para publicação em periódicos arbitrados de circulação internacional. A padronização da genética, do estado sanitário e do ambiente das espécies de animais *Mus musculus* (camundongos), *Rattus norvegicus* (ratos), *Oryctolagus cuniculus* (coelhos) e *Sus scropha domesticus* (suínos), a observação de condições adequadas no transporte, aclimação, enriquecimento do ambiente, treinamento de técnicos em experimentação animal, gestão de informação, biossegurança, dieta, anestesia, cuidados pós-operatórios, analgesia e eutanásia, aliados a projetos de pesquisa bem planejados são apresentados como etapas fundamentais para a obtenção de resultados com alto grau de acuidade, alto nível de reprodutibilidade e precisão.

UNITERMOS: Cirurgia experimental. Camundongos. Ratos. Coelhos. Suínos

*Correspondência:

Laboratório de Investigação Científica/LIM26 da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da USP
damy@usp.br

INTRODUÇÃO

Em pesquisas científicas, a utilização de animais de laboratório representa um dos dilemas mais conflitantes no debate bioético. O princípio dos 3 Rs de Russel & Burch, et al.¹ propõe a redução do número de animais utilizados em cada experimento, o refinamento das técnicas objetivando evitar a dor e o sofrimento desnecessários, e a substituição, do inglês replacement, por métodos alternativos deve ser imperativo. Ainda, o refinamento tecnológico na geração de modelos experimentais tem também levado à redução do número de animais/grupo experimental, por reduzir de maneira importante a variabilidade observada em cada experimento. Desta forma, a reflexão sobre a necessidade de um modelo biológico e a relevância do estudo devem ser aspectos fundamentais para a decisão de um pesquisador realizar um projeto utilizando animais.

A redução do número de animais em pesquisa biomédica não deve prejudicar a detecção de efeitos biológicos nem levar à repetição dos experimentos. O desenho experimental e o cálculo do tamanho da amostra, o controle de variabilidade, a hipótese estatística a ser testada, a escolha do teste estatístico para análise de dados e a interpretação dos resultados contribuem para o refinamento, permitindo a obtenção de mais informações sem aumentar o número de animais². Revisões da literatura sugeriram

que o número de animais de laboratório usados poderia ter sido reduzido obtendo-se as mesmas informações válidas estatisticamente. A publicação de resultados experimentais, mesmo que não tenham significância estatística, é fundamental para assegurar a não redundância de estudos³.

A variabilidade da amostra pode ser reduzida usando animais genética e sanitariamente homogêneos, além de controlar variáveis ambientais. Procedimentos padronizados, métodos acurados para medir as respostas e objetivos bem definidos permitem aceitar ou rejeitar a hipótese inicial, mesmo com o número de animais reduzido. O tamanho da amostra está baseado em relações matemáticas entre o valor do efeito estudado (a diferença biologicamente significativa), o desvio padrão (usualmente obtido de um piloto), o nível de significância (usualmente entre 0,05 e 0,01) e o poder da prova (usualmente entre 80% e 90%)³.

O cálculo do tamanho da amostra foi apresentado em detalhes por Scheibe⁴ e exemplificado na Tabela 1⁵, que determina o número de animais necessários para alcançar significância para $P < 0,05$ para várias diferenças entre o grupo controle e o tratado, com coeficiente de variação (CV) de 15% ou 20%. Como se observa na Tabela 1, o principal objetivo deve ser medir pequenas variações, como função do tratamento, importantíssimo para diminuir o desvio padrão ao mínimo dentro do grupo.

1. Doutorado - Médica Veterinária pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

2. Livre-Docência - Professor Associado do Departamento de Cirurgia, Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP, São Paulo, SP

3. Professor Titular do Departamento de Radiologia, Disciplina de Oncologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP, São Paulo, SP

4. Professor Titular do Departamento de Cirurgia, Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP, São Paulo, SP

Tabela 1 - Animais necessários para se obter resultados significantes estatisticamente (Extraída de Eckelman WC et al, 2007⁵)

Diferença de % entre os grupos controle e tratado	% CV devido à variabilidade biológica	Número de animais	Significância (P<0,05)
20	20	2-7	Não significativa
20	20	8	Significante
20	15	5	Significante
25	20	5	Significância limítrofe
30	20	5	Significante
25	15	5	Significante

Além da questão bioética na redução do número de animais experimentais, existe a questão legislativa. No Brasil, após tramitar por 13 anos, foi aprovada a Lei 11.794⁶, em 8/10/2008, regulamentada pelo Decreto 6.899⁷, em 15/7/2009, estabelecendo a implantação do CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e as CEUAS – Comissões de Ética no Uso de Animais, os procedimentos e as responsabilidades para uso de animais de laboratório. A falta de uma legislação federal regulamentada fez com que alguns Estados estabelecessem legislação própria. Assim, no Estado de São Paulo foi promulgada a Lei Estadual 11.977⁸, em 2005, instituindo o código de proteção aos animais, e a Lei Municipal 13943⁹, de 2004, que proíbe a entrega de cães e gatos recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses do município. No município do Rio de Janeiro alguns decretos foram sancionados e depois revogados¹⁰. Florianópolis foi o primeiro município a regulamentar o uso de animais em pesquisa e ensino¹¹.

Apesar dos entraves legislativos, nos últimos anos houve um aumento crescente de publicações sobre técnicas cirúrgicas utilizando animais experimentais¹². Desta forma, com o objetivo de contribuir para sistematizar a pesquisa em cirurgia experimental, este artigo apresenta uma análise circunstanciada da literatura pertinente, encontrada em diversas bases de dados (Medline, Scielo, Lilacs, Embase), com enfoque nos principais parâmetros exigidos que sejam observados pelos comitês internacionais e nacionais de ética e bem-estar animal¹³, e cujo cumprimento são pré-requisitos para publicação em periódicos de grande impacto.

Seleção do modelo experimental e padronização genética

Existe uma gama de modelos biológicos apropriados para cada objetivo específico por mimetizar a espécie alvo da pesquisa. As espécies animais utilizadas como modelos para o ser humano devem possuir similaridades biológicas, anatômicas e fisiológicas. A definição genética deve ser o primeiro aspecto a ser considerado, após a seleção do modelo experimental. Quando se trata de roedores, existem inúmeras linhagens de camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus*

norvegicus). O background genético e o monitoramento dos animais experimentais devem ser descritos, por exemplo, nome da linhagem, se é heterogênica (outbred), isogênica (inbred), congênica, recombinante, mutante ou transgênica¹⁴.

Quanto aos coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e suínos (*Sus scropha domesticus*) as raças devem ser definidas. A raça Nova Zelândia, branca, é a mais utilizada entre os coelhos, e as raças Large White, Landrace, Yorkshire, e Hampshire, entre os suínos. Em estudos comparativos usando animais experimentais as diferenças em fisiologia, genótipo, fenótipo e maturidade em um determinado peso e idade devem ser considerados. Os animais devem ser da mesma origem durante todo ensaio, pois mesmo animais isogênicos podem diferir de um biotério para outro.

As raças tradicionais de suínos apresentam a desvantagem de aumentar o peso de um quilo ao nascimento para 100 quilos em quatro meses de idade, alcançando aproximadamente 150 quilos em nove meses. Em consequência, esses animais são mais indicados para ensaios agudos ou com no máximo três semanas de duração¹⁵. Os suínos miniaturas, mini-pigs, têm seu uso indicado para experimentos de longa duração devido o seu pequeno tamanho e peso. Dependendo da raça, apresentam 0,5 kg ao nascer a 12-45 kg aos quatro meses de idade, alcançando os adultos entre 45-100 kg. As raças mais comumente usadas em pesquisa são: Yucatan, Hanford, Sinclair, Pitman-Moore, Goettingen. No Brasil foi desenvolvido o Minipig br¹⁶.

Qualquer que seja o modelo experimental selecionado para a pesquisa há necessidade de análise crítica das limitações inerentes às diferenças fisiológicas e anatômicas, com relação aos humanos e às doenças que potencialmente seriam contextualizadas.

Padronização sanitária do modelo biológico selecionado

Os animais convencionais podem ser portadores assintomáticos de organismos patogênicos que poderão acarretar interferências nos resultados experimentais, principalmente em observações pós-cirúrgicas de longa duração, dificultando a interpretação dos dados e a reprodutibilidade dos mesmos. Deve-se adequar a categoria sanitária de animais de laboratório ao objetivo do experimento.

Padronização do ambiente

O biotério de experimentação deve ter um ambiente padronizado no que se refere à temperatura, umidade, iluminação, ciclos de luz/escuridão, qualidade do ar, através de filtração eficiente, e 10-15 trocas de ar por hora, de modo a não permitir a recirculação. Estas condições climáticas dentro de uma sala de experimentação devem ser controladas por ajustes automáticos do equipamento de condicionamento^{17,18}.

Variações na temperatura ambiente influenciam os processos metabólicos, provocando, por exemplo, alterações na suplementação de sangue dos órgãos e a atividade de enzimas do fígado. Há também inter-relações entre a temperatura ambiente e a toxicidade de drogas. A DL₅₀ de determinados fármacos varia de acordo com a temperatura ambiente¹⁶. Uma diminuição da temperatura ambiente abaixo da capacidade do organismo para regular a temperatura do corpo aumenta a suscetibilidade dos animais a infecções. Conclui-se ser de fundamental importância o registro diário da temperatura ambiente para permitir uma

correta interpretação dos resultados. A temperatura ambiente para roedores ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), para coelhos ($18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e para suínos adultos ($16\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) deve ser mantida dentro dos limites¹⁴.

A água conduz melhor o calor que o ar. A condutividade do calor pelo ar aumenta com o conteúdo de vapor presente. Variações de temperatura e umidade ambientais podem levar à alterações patológicas nas vias respiratórias, alterações na pele e infecções. Nos ratos, umidade relativa abaixo de 40% desencadeia o quadro de *ring disease*: constrições na cauda, restringindo a circulação sanguínea, a parte distal torna-se edematosa podendo necrosar. A umidade recomendada nas salas deve ficar em torno de $45\% \pm 15\%$ ¹⁷.

A falta de ventilação adequada, aliada à alta densidade demográfica e à falta de higienização das gaiolas, leva ao aumento das concentrações de amônia no ar respirado causando irritação no epitélio de revestimento das vias aéreas superiores e aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas. Também o aumento da concentração de dióxido de carbono superior a 8% resulta em inconsciência e morte¹⁷.

Quando um pesquisador não dispõe de salas com condições climáticas adequadas, uma alternativa para manutenção de animais de experimentação seria uma estante ventilada, na qual o ar filtrado insuflado, com temperatura e umidade constantes, diretamente no interior de cada gaiola não cause turbulência, proporcionando um microambiente livre de contaminação exterior e menor concentração de gases, devido à exaustão apropriada. A ventilação individual diretamente no interior da gaiola influenciou positivamente a performance reprodutiva e diminuiu a incidência de pneumonia em ratos Wistar; reduziu também a concentração de amônia no interior da gaiola, quando comparada com os ratos mantidos em ambiente com ventilação diluída, como nas salas convencionais de criação de animais¹⁹.

A maravalha utilizada como cama para os animais deve estar livre de substâncias químicas, como inseticidas ou fungicidas, e a madeira deve ser macia e absorvente, de forma que não libere substâncias voláteis que possam afetar as enzimas microsossomais do fígado. Tanto a qualidade da maravalha como a rotina de higienização das gaiolas podem influenciar nos resultados experimentais, por determinarem uma menor concentração de amônia no ambiente e menor estresse para o animal¹⁷.

A comparação da rotina de quatro diferentes biotérios criadores de ratos Sprague-Dawley e Wistar, tendo como parâmetros a frequência de trocas de gaiolas, a concentração de amônia e o tipo de cama, indicou que a limpeza semanal diminuiu a concentração de amônia e os conflitos agressivos foram menos frequentes. O tipo de cama não afetou a concentração de amônia, porém os ratos que permaneceram em camas de aspen apresentaram mais alterações patológicas nos pulmões que os mantidos em cama de papel²⁰.

A luz estimula, via nervo óptico, o sistema hipotálamo-pituitário, levando à produção e secreção de hormônios necessários ao processo regulatório do organismo. Contribui também para a regulação do relógio interno, influenciado pela rotação da Terra. Inúmeras funções corporais e atividades do organismo ocorrem de forma cronologicamente dependente, isto é, em ritmo circadiano. Muitos resultados experimentais são influenciados pelos ritmos circadianos¹⁷.

Foi relatada a influência potencial das alterações circadianas nas rotinas laboratoriais sobre alguns parâmetros de interesse em imunologia, como peso do timo e do baço, número de leucócitos na medula óssea, no sangue periférico e no peritônio, em camundongos machos das linhagens C57bl/6J, Balb/C E Cb6 F1, com idênticas condições laboratoriais, exceto regimes de luz/escuridão. Vários parâmetros foram afetados pela inversão, concluindo-se que a extrapolação dos resultados para outras linhagens ou espécie deve ser feita com grande precaução. Todas as comparações interlinhagens, especialmente aquelas de vários laboratórios, devem sempre ser relacionadas a aspectos específicos e padronizações²¹.

A intensidade de luz em uma sala de animais experimentais deve ser de 300 a 450 lux a 1 metro acima do piso, 600 lux a 1 m do teto, diretamente abaixo da fonte de luz. As gaiolas da prateleira superior devem ser protegidas da influência direta da luz. Os ciclos devem ser de 12/12 de luz e escuridão. Em animais albinos a intensidade da luz não deve exceder 60 lux dentro das gaiolas para não provocar alterações patológicas na retina e aumentar a atividade endócrina. A fonte de luz deve ser fria, lâmpada fluorescente^{17,18}.

Muitas espécies de animais podem distinguir ultrassons. O som conduzido pelo impulso através do SNC causa consequências mensuráveis em diferentes órgãos e sistemas no organismo (Exemplo: aumento do pulso e movimentos respiratórios, aumento da pressão sanguínea, hiperatividade hormonal etc.) Ruídos na sala de animal podem levar a comportamento anormal e reações no organismo que mascaram e falseiam os resultados. Igualmente estressantes são os ruídos abruptos e irregulares. Os ruídos devem estar abaixo de 60 dB¹⁷.

Os ruídos no interior das gaiolas de dois diferentes materiais, aço inoxidável e policarbonato, durante trocas realizadas por técnico calmo e nervoso, foram monitorados por microfones no interior das gaiolas acoplados a aparelhos registradores. Os resultados mostraram que tanto o material quanto o estilo do técnico têm impacto sobre o nível de som provocado dentro da gaiola de ratos²².

O tratamento da água pode ser feito por esterilização por autoclave, filtração, hipercloração e acidificação. A hipercloração pode causar irritação das mucosas, porém a interferência nos resultados não é conhecida. A acidificação recomendada, pH entre 2,5-3, pode provocar alterações nos dentes e possíveis interferências nos resultados¹⁷. Para os suínos recomenda-se a instalação de bebedouros automáticos¹⁴.

De modo geral, os animais são seres sociais e não devem ser impedidos de interagir com outros membros da sua espécie. Se o protocolo experimental exige alojamento individual, deve ser permitido que um animal veja o outro. Principalmente os suínos, dóceis quando treinados para interação positiva com humanos, podem apresentar úlcera gástrica em situações estressantes como privação de dieta, água e variações ambientais abruptas¹⁵. A forma de alojamento afetou parâmetros séricos bioquímicos em coelhos. Os animais alojados em pares apresentaram menor variabilidade no ganho de peso e na concentração sérica de fosfatase alcalina²³.

Em cirurgia experimental, o alojamento individual se impõe. O efeito adverso provocado em camundongos alojados individualmente ou em duplas na mesma gaiola, porém separados por

uma tela, comparado com alojamento em grupo, em animais monitorados por telemetria, desde uma semana antes da cirurgia até três semanas após, indicou que, em grupo, camundongos submetidos à cirurgia abdominal foram menos afetados, e o individual parece ser melhor opção do que separados por uma tela²⁴.

Transporte e aclimação

O transporte entre o produtor e o usuário deve ser feito de maneira que a saúde e o bem-estar dos animais sejam preservados. Cada transporte deve ser cuidadosamente planejado, de modo a evitar temperaturas extremas, congestionamentos de trânsito, escolhendo ainda rotas menos distantes. Dentro da instituição deve ser feito em gaiolas protegidas por filtros, dentro de contêineres apropriados, de modo a evitar que pessoas tenham contato com alérgenos presentes na urina, saliva, pelos e cama, assim como micro-organismos, substâncias químicas ou radiológicas inoculadas nos mesmos, ou mesmo o escape dos animais.

A aclimação do animal na área de experimentação deve ser observada. Visando determinar o tempo necessário para aclimação de ratos ao novo ambiente, foram monitorados por rádio-telemetria os batimentos cardíacos, a temperatura do corpo e a atividade, através de transmissores implantados previamente, e o peso do animal, registrado antes e após o transporte. Todos os parâmetros se alteraram significativamente com exceção da temperatura. Os resultados sugeriram que há necessidade de três dias para a aclimação de ratos ao novo ambiente²⁵.

Influência do enriquecimento ambiental

Com o objetivo de aperfeiçoar o bem-estar animal, diversos pesquisadores demonstraram resultados positivos em ambiente enriquecido. Trata-se da modificação do ambiente em cativeiro para aumentar o bem-estar físico e psicológico, proporcionando estímulo para os animais encontrarem suas necessidades espécie-específicas. Exemplos de enriquecimento seriam acessórios parecidos com ninhos, tubos para servir como esconderijo, áreas de refúgio etc., tanto para roedores quanto para coelhos. Suínos mantidos em ambiente enriquecido com mangueiras, brinquedos, fitas de borracha mostraram-se menos agressivos¹⁸.

O efeito do enriquecimento ambiental sobre a resposta ao estresse fisiológico agudo causado pela contenção de camundongos por pequenos períodos em gaiolas individuais foi pesquisado. Por telemetria foram monitorados os batimentos cardíacos, a temperatura corporal e a concentração plasmática de corticosterona. Os resultados sugeriram menor resposta ao estresse pelo grupo mantido em ambiente enriquecido. Não houve efeito sobre o peso do timo e concentração de tirosina hidroxilase²⁶, enzima envolvida na biossíntese de neurotransmissores.

Treinamento de técnicos em experimentação animal

Por questões bioéticas, qualquer procedimento com animais deve ser feito por profissional habilitado. A Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA²⁷) recomenda quatro categorias de profissionais. Na categoria A existem quatro níveis em que o profissional inicia com uma formação teórico-prática e, conforme adquire experiência, evolui na escala de dificuldades para desempenho das tarefas rotineiras, com tempo previsto superior a cinco anos para completar a formação. Para as categorias B e C, a FELASA propõe cursos cuja realização

credencie os técnicos ou pesquisadores a utilizarem os animais. Por tratar-se de categorias que se renovam continuamente há uma grande demanda para sua formação.

Gestão da informação

Devido a planejamentos inadequados, execuções incompetentes de projetos, documentação insuficiente de métodos e resultados em ensaios pré-clínicos, a Food and Drug Administration (FDA-UsA) propôs princípios regulatórios sobre as boas práticas de laboratório em 1979 e a Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)²⁸ propôs princípios a serem usados internacionalmente em 1981. No Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro)²⁹ credencia os laboratório de acordo com as diretrizes estabelecidas pela OECD.

Os princípios da GLP não estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de projeto científico, entretanto a adesão estrita a GLP removerá muitas fontes de erros e incertezas. Através da aplicação de validade técnica e procedimentos operacionais-padrão aprovados, erros sistemáticos e artefatos podem ser evitados.

Biossegurança

Quando se trata de organismos geneticamente modificados deve-se consultar as resoluções normativas elaboradas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)³⁰. Conhecendo-se os riscos pode-se estabelecer um programa, abrangendo desde o próprio fluxo das instalações até os procedimentos emergenciais e a eliminação de resíduos.

A Instrução Normativa nº 1 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) classifica os animais geneticamente modificados em quatro níveis de biossegurança, assim como os biotérios. Os níveis de biossegurança do biotério e salas de experimentação deverão ser sempre iguais ou maior que o nível de biossegurança do animal geneticamente modificado a ser utilizado. O credenciamento de biotérios e salas de experimentação será realizado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da instituição interessada e deverá ser comunicado à CTNBio no seu relatório anual.

Dieta

A dieta tem um profundo impacto nos resultados experimentais, não somente com relação às concentrações adequadas de nutrientes, mas também aos não-nutrientes. Tanto os ingredientes de origem vegetal como animal podem conter uma variedade de substâncias fisiologicamente ativas, naturais ou como resultado de contaminação. Algumas com importância em experimentação animal são: micotoxinas, nitrosaminas, pesticidas, formas orgânicas de metais pesados, saponinas e fitoestrógenos, sendo que muitas possuem propriedades carcinogênicas¹⁴.

O conteúdo/composição da dieta deve ser sempre verificado quanto ao seu efetivo potencial de absorção. Por exemplo, proteínas derivadas de penas são menos absorvíveis que as de outras fontes. Aminoácidos essenciais devem estar presentes em quantidade suficiente e em proporção certa.

CONSIDERAÇÕES ANESTÉSICAS

Camundongos e ratos

Os cuidados pré-anestésicos de roedores devem incluir

uma revisão do histórico sanitário da colônia e aspecto físico do animal. A administração parenteral do agente anestésico constitui o método mais comum em roedores. O volume da droga, o local da administração e propriedades irritantes do agente devem ser considerados. Para minimizar erros em injeções intraperitoneal, o jejum de quatro horas e o uso de agulha 20-22 são recomendados. A água não deve ser restringida. Na Tabela 2 estão representadas as doses, vias de inoculação e principais precauções, segundo Handbook of Johns Hopkins University³¹

Coelhos

Nesta espécie, o ceco pode atuar como um reservatório para o anestésico alterando o efeito da droga. Recomenda-se calcular a dose baseadas no peso metabólico (peso do corpo x 0,75). A idade, o sexo, a raça e a linhagem, peso do corpo e período do dia afetam a resposta às drogas anestésicas. Não há

necessidade de jejum, porque os coelhos apresentam uma alta taxa metabólica e baixo risco de vômito. Recomenda-se tubos de 2 a 4 mm de diâmetro para intubação endotraqueal, lembrando que somente deve ser feito por pessoas treinadas, por apresentar alta dificuldade para sua realização, aplicando-se anestésico local na laringe para prevenir laringoespasma. Há necessidade de suplementação de oxigênio em animais anestesiados com barbitúricos, ou outros agentes que reduzem as funções respiratórias. A profundidade da anestesia é avaliada pela resposta ao pinçamento da orelha, reflexo palpebral e corneal. Os coelhos possuem altas concentrações de catecolaminas circulantes. Uma repentina consciência pode levar a um aumento da circulação de catecolaminas levando a uma arritmia cardíaca fatal³¹.

Suínos

Os suínos são muito sensíveis à contenção e à anestesia. Em alguns casos estes eventos produzem hipertermia maligna,

Tabela 2- Agente anestésico, vias de inoculação e principais precauções para camundongos, ratos, coelhos e suínos (Extraído parcialmente de Use of Experimental Animals at Johns Hopkins University³¹)

Agente anestésico	Dose	Precauções
CAMUNDONGOS		
Cloridrato de cetami na (C) [Ketalar®, Ketamin®] + cloridrato de xilazine (X) [Rompum®, Anasedan®]	100 mg/kg (C) IM + 5 -16 mg/kg (X) IP 80-100mg/kg (C) + 10 (X) mg/kg IP	A cetamina inibe o piscar de olhos, a lubrificação ocular é necessária para evitar ulcerações da córnea. O tempo de anestesia é de 60-100 minutos variando a profundidade.
Cloridrato de Cetamine + Cloridrato de xilazine+ Acepromazina [Acepran®]	100 mg/kg (C) +20mg/kg (X) + 3mg/kg (A) IP	Excelente taxa de sobrevivência e profundidade anestésica quando comparado com outras combinações. A dose varia com a linhagem do camundongo.
Pentobarbital	60 mg/kg IP	Duração do efeito muito variável entre linhagens, sexo e idade do camundongo.
Cloridrato de dexmedetomidina (M) [Precedex®] + fentanila (F) [Fentanest®]	0,6mg/kg (M) + 0.06 mg/kg (F) IM	Duração do efeito entre 20-30 minutos.
Cloridrato de Cetamina+Cloridrato de dexmedetomidina (M)	Macho: 50mg/kg (C) + 10 mg/kg (M) IP Fêmea: 75 mg/kg (C) + 1-2,5 mg/kg (M) IP	Combinação produz leve anestesia e boa imobilização. Para coleta de sangue retroorbital usar anestésico oftálmico local.
RATOS		
Acepromazina	0,5-1,0 mg/kg IM 2,0-5,0 mg/kg SC, IP	Provoca sedação em combinação com cetamina.
Sulfato de atropina	0,05-0,10 mg/kg SC 0,4 mg/kg SC, IM	Algumas linhagens possuem atropinesterase no soro
Cloridrato de cetamina + cloridrato de xilazina	75-95 mg/kg (C) + 5 mg/kg (X) IM ou IP 40-75 mg/kg (C) + 5-10 mg/kg (X) IP	Anestesia
Cloridrato de Cetamine + Acepromazine (A)	75 mg/kg (C) + 2.5 mg/kg (A) IP	Anestesia
Cloridrato de Cetamine + Cloridrato de dexmedetomidina	75 mg/kg (C) + 0.5 mg/kg (M) IP	Anestesia
Pentobarbital	30-45 mg/kg IP	Diluição em solução fisiológica menor que 10 mg/kg

COELHOS		
Pré-anestésicos		
Glicopirrolato [Robinul®]	0,01-mg/kg IV 0,1mg/kg IM, SC	Duração 60 minutos. Alguns coelhos produzem atropinesterase. Efeito agente anticolinérgico em coelhos.
Diazepam [Valium®, Dienpax®]	0,5-5 mg/kg	Efeitos cardiovasculares mínimos quando usado sozinho.
Midazolam [Dormonid®]	0,01-0,1 mg/kg IM, IV	Pode ser misturado com outras drogas ou soluções.
Anestésicos		
Cloridrato de Cetamina + Cloridrato de xilazina	35-50 mg/kg IM (C) + 5-10 mg/kg IM (X) ou 10 mg/kg IV © + 3 mg/kg IV (X) Infusão contínua IV : 25 mg/kg (C) + 5mg/kg (X). Dar o primeiro 1/3 em 1 minuto, e o restante vagarosamente nos próximos 4 minutos.	Depressão respiratória, hipotensão e hipóxia são comuns. Não recomendado para procedimentos intratorácicos e intra-abdominais. Injeções locais causam irritação. A infusão provoca bom relaxamento muscular e analgesia, moderada depressão respiratória e cardíaca e grave hipotensão.
Cloridrato de Cetamina + Cloridrato de xilazina + Butorfanol [Stadol®]	35 mg/kg + 5 mg/kg + 0.1 mg/kg IM	Perda de reflexos mais prolongados e menor hipotensão do que a combinação C/X
Cloridrato de cetamina + cloridrato de dexmedetomidina	25 mg/kg + 0,5 mg/kg (M)	Duração de 90 a 180 minutos. Baixa mortalidade.
Pentobarbital	20-60 mg/kg IV	Infiltração perivascular resulta em necrose local do tecido. Os opioides modificam o tempo de duração da ação de pentobarbital.
Tiopental		Infiltração perivascular resulta em necrose local do tecido.
SUÍNOS		
Pré-anestésicos		
Sulfato de atropina	0,07-0,09 mg/kg IM	Administrar 15-30 minutos antes da indução da anestesia.
Acepromazina	0,11-0,22 mg/kg IM	
Glicopirrolato	0,004-0,01mg/kg IM	Duração 30 minutos.
Cloridrato de Cetamina + Acepromazina	33 mg/kg + 1,1mg/kg IM	Duração 30 minutos, provoca moderada cardiodepressão.
Cloridrato de Cetamina + Cloridrato de xilazina	20 mg/kg IM + 2 mg/kg IM	Recomenda-se o uso de anticolinérgicos para vencer a cardiodepressão provocada pela xilazina. Possibilita a intubação endotraqueal.
Anestésicos		
Tiopental	6,6-25mg/kg IV 3-6 mg/kg/h em infusão contínua IV	Ação muito curta, eliminado pelos rins, provoca grave depressão cardiopulmonar.
Pentobarbital	20-40 mg/kg IV 5-15 mg/kg/h em infusão contínua IV	Duração de 20-30 minutos, metabolizado pelo fígado, provoca maior cardiodepressão que o tiopental, recuperação longa. O uso de cetamina como pré-anestésico aumenta o tempo de efeito do pentobarbital.
Propofol	Indução com 0,83-1,66 mg/kg IV, seguida de bolus IV de 14-20mg/kg/h	Necessita de pré-indução. Usado em protocolos cardiovasculares.

Tabela 3- Analgésicos, doses e vias de inoculação para camundongos, ratos, coelhos e suínos (Extraído parcialmente de Use of Experimental Animals at Johns Hopkins University³¹)

Agente	Dose	Recomendação
CAMUNDONGOS		
Buprenorfina [Subutex®, Temgesic®]	0,05-0,15 mg/kg, SC cada 6-12h	Para dor discreta a moderada. Duração do efeito de 3-5 horas.
Butorfanol [Turbogestic®, Stadol®]	1,0-2,0 mg/kg SC cada 4h	Para dor moderada, analgesia menos efetiva com duração de 1-2 horas.
Sulfato de morfina [Dimorf®]	0.98 mg/kg SC 2-5 mg/gk IM, SC cada 4h	Para dor intensa.
RATOS		
Acetaminofenol [Tylenol®]	1-2 mg/ml na água do bebedouro	Para dor discreta.
Ácido acetil salicílico [Aspirina®, Melhoral®]	100-150 mg/kg oral	Para dor discreta, a cada 4 horas.
Buprenorfina	0,01-0,05 mg/kg SC 0,02-0,5 mg/kg SC, IP, IM	Para dor moderada. 8-10 horas de duração 6-12 horas de duração
Carprofeno [Rimadyl®]	5-10 mg/kg SC, oral	Para dor moderada.
Sulfato de morfina	2,5-5,0 mg/kg SC	Para dor intensa, 2-4 horas de duração.
COELHOS		
Buprenorfina	0,01-0,05 mg/kg SC, IV	Duração 6-12 horas. Recomendado para dor moderada.
Acetaminofenol	1 ml /100 ml na água do bebedouro	Recomendado para dor moderada
Sulfato de morfina	2-5 mg/kg SC ou IM	Duração 2-4 horas. Provoca potente analgesia com média sedação e depressão respiratória.
SUÍNOS		
Ácido acetil salicílico	10 mg/kg via oral	Para dor moderada, administrado com protetor estomacal. Pode ser administrado adicionado a xaropes adocicados.
Buprenorfina	0,01mg/kg IV cada 6 horas ou 0,02mg/kg IV cada 10h 0,005-0.1mg/kg cada 12h IM	Menos efetivo como analgésico em caso de inflamação, falência de órgãos ou doença sistêmica.
Fentanila	0,05mg/kg IM cada 2 horas 50-100 µg/kg/h IV	No mini-suíno deve-se usar a via transdermal.
Lidocaina e prilocaina creme	Tópico, aplicar 2 mm do creme na pele 45 minutos antes do procedimento.	Previne a dor associada com coleta de sangue e injeções intravenosas na orelha.
Cetoprofeno [Profenid®]	1-3mg/kg oral cada 12h	Potente inibidor não seletivo das enzimas COX, bom analgésico e anti-inflamatório.

que provoca rigidez muscular, taquipneia, taquicardia e hipertermia retal seguida pela dispneia, arritmias cardíacas, apneia e morte. A preparação pré-anestésica deve incluir jejum dietético de 12 horas e hídrico de 4-12 horas. A anestesia profunda provoca falta do tônus da mandíbula e ausência de reflexo ao pinçamento da membrana interdital. Os reflexos oculares não são bons indicadores de profundidade. Há necessidade de intubação endotraqueal e suplementação de oxigênio em animais. Em procedimentos cirúrgicos longos recomenda-se associar aos anestésicos, analgésicos e bloqueadores neuromusculares.

Cuidados pós-operatórios e analgesia

A recuperação dos animais deve ser feita em sala aquecida, sem ruídos e com luz reduzida. A supressão do sofrimento e da dor deve ser uma das prioridades da experimentação animal. Os procedimentos cirúrgicos invasivos são suscetíveis de causarem dor e o estresse pós-operatório pode comprometer seriamente o bem-estar animal. A temperatura deve estar em torno de 25°C para evitar hipotermia. Os comitês internacionais recomendam enfermagem em tempo integral nas primeiras 48 horas. A dor no pós-operatório deve ser pesquisada sistematicamente para determinar se o animal necessita da administração de analgésico. A pesquisa 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; alteração na vocalização, 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. Avaliação do local da cirurgia: eritema, edema, descargas etc.³²

A utilização de opioides e m suínos submetidos à cirurgia experimental ilustra o impacto da analgesia nos resultados experimentais. Para dois grupos de suínos, ambos recebendo o mesmo tratamento pré e anestésico, e um deles recebendo tratamento com morfina epidural no pré-operatório, e fentanila transdermal no pós operatório, resultou em recuperação mais rápida, maior ganho de peso no período pós-cirúrgico, a concentração de cortisol diferiu imediatamente após a cirurgia, porém a concentração de endorfina não apresentou diferença entre os grupos³³.

O *American College of Anesthesiologists*³⁴ recomenda a observação do escore para pesquisa de dor aguda. O julgamento clínico deve ser usado para determinar a necessidade de administração de drogas. Os analgésicos recomendados, doses e vias de inoculação segundo as espécies estão representados na Tabela 3³¹.

Eutanásia

A eutanásia, o sacrifício humanitário com o mínimo de dor, medo e angústia, deve estar prevista no protocolo experimental e realizada ao final do experimento. No entanto, a obrigação legal e moral de salvaguardar o bem-estar do animal e minimizar o desconforto deve ser assegurada por sistema de vigilância, isto é, planilhas de registro de alterações clínicas, com escore de

dor, para identificação de problemas e determinar o momento que o animal afetado gravemente deverá ser eutanasiado para evitar sofrimento desnecessário, mesmo antes da data prevista. A avaliação deverá ser feita baseada na perda de peso, na deterioração do estado clínico, sintomas específicos relacionados à doença induzida. O bem-estar animal é um pré-requisito para resultados experimentais mais realísticos, portanto devem ser usados procedimentos que reduzam o sofrimento dos animais e melhore o seu bem-estar^{35,36}.

Os agentes da eutanásia, a classificação, modo de ação, rapidez, facilidade de execução, biossegurança, indicação por espécie, eficácia e comentários foram detalhadamente apresentados pela *AVMA Guidelines on Euthanasia*³⁷.

CONCLUSÃO

O dramatismo³⁸ do animal, formado pelo genótipo, o fenótipo e ambiente, incluindo neste todos os itens apresentados acima, aliados aos projetos de pesquisa bem planejados, utilizando técnicas sensíveis para detecção de diferenças biológicas, coleta de dados e análise estatística adequada, são pré-requisitos necessários para a redução do número de animais na pesquisa e a obtenção de resultados com alto grau de acuidade, alto nível de reprodutibilidade e precisão.

Conflito de interesse: não há

SUMMARY

FUNDAMENTAL ASPECTS ON ANIMAL RESEARCH AS APPLIED TO EXPERIMENTAL SURGERY

This study aimed to present the general principles for experiments performed on laboratory animals as required by international and national ethical committees on animal welfare. Compliance to these principles is a prerequisite for publication in international journals. Details of genetic, sanitary and environmental standards, transportation, acclimation, environmental enrichment, appropriate education and training of all those involved in handling of live animals, information management strategy, biossecurity, diet, anesthesia, analgesia, postoperative care and euthanasia for Mus musculus (mice), Rattus norvegicus (rat), Oryctolagus cuniculus (rabbit) and Sus scropha domesticus (pig) combined with well planned biomedical research are fundamental to increase the accuracy, reproducibility and precision of the experimental results. [Rev Assoc Med Bras 2010; 56(1): 103-111]

KEY WORDS: Experimental surgery. Mouse. Rats. Rabbits. Swine

REFERÊNCIAS

1. Russell WMS, Burch KL. The principles of humane experimental technique. UFAW, London: UFAW; 1992. [cited 2008 jan]. Available from: <http://altweb.jhsph.edu/>.
2. Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. ILAR J. 2002;43:244-58.
3. Puopolo M. Biostatistical approaches to reducing the number of animals used in biomedical research. Ann Ist Super Sanità. 2004;40:157-63.
4. Scheibe PO. Number of samples-hypothesis testing. Nucl Med Biol. 2008;35:3-9.
5. Eckelman WC, Kilbourn MR, Joyal JL, Labiris R, Valliant JF. Justifying the number for each experiment. Nucl Med Biol. 2007;34:229-232.
6. Brasil. Presidência da República. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 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.
7. Brasil. Presidência da República. Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, estabelece 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 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências.
 8. São Paulo. Lei Estadual nº 11.977, de 25 de agosto de 2005, institui o código de proteção aos animais do Estado de São Paulo e dá outras providências.
 9. São Paulo. Lei Municipal nº 13.943, de 29 de dezembro de 2004, proíbe a entrega de animais capturados nas ruas para instituições e centros de pesquisa e ensino.
 10. Marques RG, Miranda ML, Caetano CER, Biondo-Simões MLP. Rumo à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil. *Acta Cir Bras.* 2005;20:262-7.
 11. Florianópolis. Decreto Municipal 5501, 2008, regulamentou a Lei 7486/2007.
 12. Goldenberg S, Goldenberg A, Ferreira LM, Montero EDS. *Clinical research.* *Acta Cir Bras.* 2005;20:270-1.
 13. NRC. National Research Council. Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório. Editores: AAALAC & COBEA. Goiânia: Gráfica UFC; 2003.
 14. Poole TB. *The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals.* London: Longman Scientific & Technical; 1999.
 15. Swindle MM, Smith AC, Laber-Laird K, Dungan L. Swine in biomedical research: management and models. *ILAR J.* 1994;36:39.
 16. Mariano M. Minipig (minipig) na pesquisa biomédica experimental. *O Minipig br.* *Acta Cir Bras.* 2003;18:387-91.
 17. Heine WO. *Environmental management in laboratory animal units.* Berlin: Pabst Science Publishers; 1998.
 18. Ruys T. *Handbook of facilities planning.* New York: Van Nostrand Reinhold; 1991.
 19. Teixeira MA, Chaguri LCAG, Carissimi AS, Souza NL, Mori CMC, Saldiva PHN, et al. Effects of an individually ventilated cage system on the airway integrity of rats (*Rattus norvegicus*) in a laboratory in Brazil. *Lab Anim.* 2006;40:419-31.
 20. Burn CC, Peters A, Day MJ, Mason JG. Long-term effects of cage-cleaning frequency and bedding type on laboratory rat health, welfare, and handleability: a cross-laboratory study. *Lab Anim.* 2006;40:353-70.
 21. Kolaczowska E, Chadzinska M, Seljelid R, Plytycz B. Strain differences in some immune parameters can be obscured by circadian variations and laboratory routines: studies of male C57BL/6J, Balb/c and CB6 F1 mice. *Lab Anim.* 2001;35:91-100.
 22. Voipio HM, Nevalainen T, Halonen P, Hakumaki M, Bjork E. Role of cage material, working style and hearing sensitivity in perception of animal care noise. *Lab Anim.* 2006;40:400-9.
 23. Nevalainen TO, Nevalainen JI, Guhad FA, Lang CM. Pair housing of rabbits reduces variances in growth rates and serum alkaline phosphatase levels. *Lab Anim.* 2007;41:432-40.
 24. Van Loo PLP, Kuin N, Sommer R, Avsaroglu H, Pham T, Baumans V. Impact of living apart together on postoperative recovery of mice compared with social and individual housing. *Lab Anim.* 2007;41:441-55.
 25. Capdevila S, Giral M, Ruiz de La Torre JL, Russell RJ, Kramer K. Acclimatization of rats after ground transportation to a new animal facility. *Lab Anim.* 2007;41:255-61.
 26. Meijer MK, Sommer R, Spruijt BM, Van Zutphen LFM, Baumans V. Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. *Lab Anim.* 2007;41:161-73.
 27. FELASA - Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias del Animal de Laboratorio. Estudios y la Formación de las Personas que trabajan con Animales de Laboratorio: Categorías A y C. [cited 2008 feb 13]. Available from: <http://www.hulp.es/secal/secal.html>.
 28. OEC/WHO. World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Good Laboratory Practice GLP. Quality Practices for regulated non-clinical research and development. [cited 2008 mar 15]. Available from: <http://www.oecd.org/ehs>.
 29. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. [citado 16 mar 2008]. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/descricaoOrgs.asp#laboratorio>.
 30. Brasil. Presidência da República. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do parágrafo 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB.
 31. John Hopkins University Animal care and use. [cited 2009 oct 2009]. Available from: <http://web.jhu.edu/animalcare/rd/index.html>.
 32. Stasiak KL, Maul D, French E, Hellyer PW, Vandewoude S. Species-specific assessment of pain in laboratory animals. *Contemp Top.* 2003;42:13-9.
 33. Malavasi LM, Nyman G, Augustsson H, Jacobson M, Jensen-Waern M. Effects of epidural morphine and transdermal fentanyl analgesia on physiology and behaviour after abdominal surgery in pigs. *Lab Anim.* 2006;40:16-27.
 34. Swindle MM. Pain assessment in swine. *Technical Bulletin.* [cited 2009 oct 7]. Available from:
 35. FELASA - Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias de Animal de Laboratorio. Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación. [citado 13 fev 2008]. Disponível em: www.hulp.es/secal/secal.html.
 36. Morton DB. Ethical aspects of the use of animal models of infection. In: Zak O, Sand MA, editors. *Handbook of animal models of infection.* San Diego: Academic Press; 1999. p.30-48.
 37. AVMA Guidelines on Euthanasia. [cited 2008 may]. Available from: http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf.
 38. Obrink KJ, Rehlinger C. Animal definition: a necessity for the validity of animal experiments *Lab Anim.* 2000;34:121-30.

Artigo recebido: 30/06/08
Aceito para publicação: 19/09/09
