



MODELOS EXPERIMENTAIS

PESQUISA COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

THÁRCIA KIARA BESERRA DE OLIVEIRA
PAULO ROBERTO DA SILVA JÚNIOR
JOSÉ AUGUSTO ANDRADE FILHO

THÁRCIA KIARA BESERRA DE OLIVEIRA
PAULO ROBERTO DA SILVA JÚNIOR
JOSÉ AUGUSTO ANDRADE FILHO

MODELOS EXPERIMENTAIS
PESQUISA COM ANIMAIS
DE LABORATÓRIO

ARACAJU, 2019



**INSTITUTO
FEDERAL**
Sergipe

MODELOS EXPERIMENTAIS: PESQUISA COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Thárcia Kiara Beserra de Oliveira

Paulo Roberto da Silva Júnior

José Augusto Andrade Filho

Editora-Chefe: Vanina Cardoso Viana Andrade

Conselho editorial:

Diego Ramos Feitosa

Jéssika Lima Santos

Júlio César Nunes Ramiro

César de Oliveira Santos

Kelly Cristina Barbosa

Salim Silva Souza

Capa: Thiago Estácio

Projeto gráfico e diagramação: Thiago Estácio

Nenhuma parte dessa obra pode ser utilizada ou reproduzida sem autorização dos editores.

©2019 by Thárcia Kiara Beserra de Oliveira

Dados internacionais de Catalogação na publicação (CIP)

O48m	Oliveira, Thárcia Kiara Beserra de Modelos experimentais [recurso eletrônico] : pesquisa com animais de laboratório / Thárcia Kiara Beserra de Oliveira, Paulo Roberto da Silva Júnior, José Augusto Andrade Filho – 1. ed. Aracaju: IFS, 2019. 76 p.: il.
	Formato: e-book ISBN 978-85-9591-102-4
	1. Animais de laboratório. 2. Biotério. 3. Experiência científica. 4. Vacinas. 5. Medicamentos. 6. Cosméticos. I. Silva Júnior, Paulo Roberto da. II. Andrade Filho, José Augusto. III. Título.
	CDU: 502:001.891

Ficha catalográfica elaborada pela Direção Geral de Bibliotecas do IFS

IFS

Avenida Jorge Amado, 1551 - Loteamento Garcia

Bairro Jardins - Aracaju / Sergipe.

CEP.: 49025-330 TEL: 55 (79) 3711-1437. E-mail: edifs@ifs.edu.br.

Impresso no Brasil – 2019



Ministério da Educação

**Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia de Sergipe**

Presidente da República

Jair Messias Bolsonaro

Ministro da Educação

Abraham Bragança de Vasconcellos Weintraub

Secretário da Educação Profissional e Tecnológica

Ariosto Antunes Culau

Reitora do IFS

Ruth Sales Gama de Andrade

Pró-reitora de Pesquisa e Extensão

Chirlaine Cristine Gonçalves

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Sergipe (IFS) pelo empenho e dedicação à pesquisa, contribuição para o desenvolvimento da ciência e pela oportunidade de publicação deste livro.

APRESENTAÇÃO

A utilização de animais em ensino e pesquisas científicas tem trazido inúmeras discussões acendidas em todo o mundo, mas, sobretudo, acordamos que as pesquisas tornaram-se um caminho para se avançar no conhecimento sobre a ciência em saúde.

Não pretendemos esgotar as metodologias usadas nas pesquisas experimentais; entretanto, esta obra transcorre sobre alguns modelos usados com animais de laboratório. São metodologias que proporcionará ao leitor (acadêmicos, professores e pesquisadores) um guia de procedimentos e metodologias para seus experimentos.

O avanço nos estudos biológicos, muitas vezes, requer a utilização dos mesmos, porem tais procedimentos deve ser rigorosamente analisado para que se tenha relevância a saúde humana ou animal de forma ética. A pesquisa com animais torna-se parte integrante e imprescindível no desenvolvimento da ciência, porem, métodos alternativos devem ser prioritários em todas as pesquisas.

Apesar de continuarmos perseguindo esse objetivo, a meta mais realista é reduzir o número de animais utilizados com finalidade científica, associando diferentes técnicas às alternativas já existentes e, sempre, implantar os princípios dos 3R's na experimentação; **Redução**, usar sempre o menor número de animais possível para o objeto de investigação; **Replacement**, se remete ao uso de modelos alternativos de investigação e **Refinement**, refinar as técnicas para que o desconforto seja reduzido ao mínimo.

Destacamos que todas as pesquisas que de uma forma direta utilizem animais em seus procedimentos devem ser analisados previamente pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Thárcia Kiara Beserra de Oliveira

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE OBESIDADE EM MURINOS 13

1. INTRODUÇÃO13

2. MODELOS DE INDUÇÃO DE OBESIDADE14

2.1. Indução da obesidade por lesão do núcleo hipotalâmico ventromedial pela administração de glutamato monossódico 14

2.2. Indução da obesidade por lesão do núcleo paraventricular hipotalâmico..... 15

2.3. Indução da obesidade por ooforectomia bilateral..... 17

2.4. Dieta hiperlipídica de encéfalo bovino na indução de obesidade 17

2.5. Obesidade induzida por dieta hipercalórica de sacarose em ratos 18

2.6. Modelo experimental de obesidade por leite condensado e sacarose 19

2.7. Modelo experimental de obesidade por dieta de cafeteria..... 19

2.8. Indução da obesidade por lesão eletrolítica do núcleo ventromedial hipotalâmico 20

REFERÊNCIAS..... 24

CAPÍTULO 2

MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO DE DIABETES MELLITUS27

1. INTRODUÇÃO 27

2. MODELOS DE INDUÇÃO DE DIABETES MELLITUS 28

2.1 Indução por aloxana 28

2.2. Indução por estreptozotocina (STZ)	30
2.3. Indução por pancreatectomia parcial	33
2.4. Indução por dieta hiperlipídica.....	34
2.5. Indução por administração parenteral de nitrilotriacetato férrico	35
3. DISCUSSÃO	36
4. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS.....	37

CAPÍTULO 3

MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO E CICATRIZAÇÃO

1. INTRODUÇÃO	39
2. MODELOS DE INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO E CICATRIZAÇÃO.....	40
2.1. Indução de queimadura por alta temperatura	40
2.2. Indução química de inflamação em pata por carragenina	41
2.3. Indução de ulcera gástrica por etanol	41
2.4. Indução de ferida por lesão mecânica	42
2.5. Indução de tendinite por colagenase	43
2.6. Edema de pata	43
2.7. Indução de lesão hepática por ingesta estrita de dieta líquida alcoólica associada a injeção intraperitoneal de tetracloro de carbono	44
2.8. Indução de pancreatite aguda por L-arginina	45
2.9. Indução de peritonite por injeção intraperitoneal de carragenina	45
3. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS.....	47

CAPÍTULO 4

MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO DE INFECÇÕES.....

1. INTRODUÇÃO	49
----------------------------	-----------

2. MODELOS DE INDUÇÃO DE INFECÇÕES	50
2.1. Indução de peritonite por ligadura e punção do ceco.	50
2.2. Indução de queimadura	52
2.3. Indução de endocardite por <i>C. albicans</i>	53
2.4. Indução de ferida cirúrgica	54
3. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	56

CAPÍTULO 5

METODOLOGIAS DE ESTUDOS TOXICOLÓGICOS PRÉ-CLÍNICOS: <i>IN VITRO</i> e <i>IN VIVO</i>.....	59
1. INTRODUÇÃO	59
2. ESTUDOS DE TOXICIDADE <i>IN VITRO</i>.....	60
2.1. Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i> Leach.....	60
2.2. Análise de viabilidade celular pelo ensaio de MTT ...	62
2.3. Análise de ciclo celular por citometria de fluxo	64
3. ESTUDOS DE TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>.....	66
3.1. Ensaio da toxicidade aguda com pequenos roedores	67
3.2. Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda oral	70
3.3. Ensaio da toxicidade crônica (doses repetidas) com pequenos roedores	73
REFERÊNCIAS.....	75

CAPÍTULO 1

MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE OBESIDADE EM MURINOS

*Paulo Roberto da Silva Júnior
Hianny Ribeiro Cabral
Jessyka Ferreira Gomes de Oliveira*

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é hoje um dos problemas de saúde pública mais relevante, afetando, principalmente, as populações dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (STRAUSS et al., 2001). Em 2015 aproximadamente 108 milhões de crianças e 604 milhões de adultos no mundo eram obesas, trazendo consigo comorbidades associadas a tal patologia (AFSHIN et al., 2017).

É sabido que o sobrepeso e a obesidade estão associados a um significativo aumento na morbimortalidade, estando relacionados doenças como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, doenças cardiovasculares, acidentes vasculares encefálicos, síndrome da apneia obstrutiva do sono e câncer (KAPLAN et al., 2018).

Todos os pacientes adultos devem ser alvo de rastreio da obesidade e do sobrepeso, a fim de se estabelecer o diagnóstico e de se instituir uma modalidade terapêutica adequada, diminuindo os fatores de risco e aumentando a sua qualidade de vida (KAPLAN et al., 2018). O Índice de Massa Corporal (IMC) deve ser calculado rotineiramente na consulta médica e os indivíduos com IMC entre 25 e 35 kg/m² deve ter sua circunferência abdominal avaliada (GALLAGHER et al., 1996).

O IMC é simples de ser obtido e se correlaciona com o percentual de gordura corporal, sendo a razão entre a altura em metros e o quadrado do peso em quilogramas (kg/m²). Entretanto, deve-se atentar ao fato de que

indivíduos com alto teor de massa muscular podem ter o IMC superestimado, mesmo quando não apresentam sobrepeso (MEI et al., 2002).

A Organização Mundial de Saúde, juntamente com o National Institutes of Health, estabeleceram classificações do IMC baseados no risco de doença cardiovascular, sendo esta classificação validada para caucasianos, hispânicos e negros. Classificação para adultos: IMC < 18,5 – abaixo do peso, IMC 18,5 a 24,9 – peso normal, IMC 25 a 29,9 – sobrepeso, IMC 30 a 34,9 – Obesidade grau I, IMC 35 a 39,9 – Obesidade grau II, IMC > 39,9 – Obesidade grau III. Devido as peculiaridades de crescimento, a fórmula do IMC para adultos não se aplica às crianças e adolescentes, variando de acordo com a idade. (WHO, 2000).

Da mesma forma que a obesidade tem causa multifatorial, seu tratamento deve ser empregado de forma abrangente, a fim de prevenir, reverter ou diminuir os fatores de riscos ocasionados por tal patologia (BRAY, 2016). Juntamente com uma dieta equilibrada, a prática regular de exercícios físicos e a modificação do estilo de vida, a terapia medicamentosa pode ser de grande ajuda no seu tratamento, devendo ser instituída de acordo com as necessidades individuais de cada paciente (JENSEN et al., 2014).

Opções farmacológicas para o tratamento da obesidade incluem lorcaserina, liraglutida, orlistat, topiramato, bupropiona, pentermina, benzo-fetamina, fendimetrazina e dietilpropiona. São candidatos ao tratamento farmacológico aqueles com IMC > 30 kg/m² e aqueles com IMC entre 27 e 29.9 kg/m² com comorbidades ou que não atingiram as metas de redução de peso, mesmo com a mudança do estilo de vida (BRAY et al., 2012).

Este capítulo tem como objetivo sumarizar os principais modelos experimentais de indução de obesidade em murinos, a fim de mimetizar condições propícias a novos estudos sobre sua fisiopatologia, comorbidades e novas abordagens terapêuticas, diminuindo, assim, os riscos inerentes a esta patologia e aumentando a qualidade de vida dos pacientes.

2. MODELOS DE INDUÇÃO DE OBESIDADE

2.1. INDUÇÃO DA OBESIDADE POR LESÃO DO NÚCLEO HIPOTALÂMICO VENTROMEDIAL PELA

ADMINISTRAÇÃO DE GLUTAMATO MONOSSÓDICO

Materiais: Seringas de insulina, glutamato monossódico injetável.

Animais utilizados: Ratos Wistar isogênicos.

Procedimento: No dia do nascimento de uma linhagem isogênica de ratos Wistar, os recém-nascidos devem ser aleatoriamente divididos em dois grupos: Grupo 1 (GI) e Grupo Controle (GC). Aos 2º e 4º dias pós-natais, os ratos do GI recebem por via subcutânea, uma solução de 2mg/kg de glutamato monossódico + 0.01mL/kg de solução salina. Posteriormente, nos dias 06, 08 e 10, estes são submetidos a administração de 4mg/kg de glutamato monossódico por via SC (HERNANDEZ-BAUTISTA et al., 2014).

Os ratos do grupo controle receberam pela mesma via de administração e nos mesmos dias uma quantidade equivalente de solução salina. Os animais devem ser separados por sexo, mantidos em ciclo de claro-escuro de 12h, a uma temperatura média de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, com ração e água ad libitum (HERNANDEZ-BAUTISTA et al., 2014).

Finalização: Os testes fisiológicos devem ser realizados nos 4 grupos aos 04, 08, 12, 16 e 20 meses de idade (HERNANDEZ-BAUTISTA et al., 2014). Após os testes, os animais utilizados são submetidos a eutanásia, respeitando os princípios éticos estabelecidos pela legislação vigente.

2.2. INDUÇÃO DA OBESIDADE POR LESÃO DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR HIPOTALÂMICO

Materiais: Óleo vegetal, ração comercial padrão, pentobarbital, ketamina.

Animais utilizados: Ratas Sprague-Dawley.

Procedimento: Divide-se as ratas em dois grupos: grupo controle (GC) e grupo experimento (GE). Cada animal deve ser acomodado individualmente em gaiola de polipropileno, em ambiente com luz (ciclo

claro/escuro 12/12horas), e temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) controladas, devendo ser oferecido ração comercial padrão e água ad libitum. Antes da cirurgia, a alimentação deverá ser mantida e 24 horas após o procedimento cirúrgico deverá ser disponibilizado dieta hiperlipídica, composta por 67% de ração comercial padrão e 33% de óleo vegetal (peso/peso)(SIMS et al., 1986).

Para o procedimento cirúrgico os ratos devem ser anestesiados com 35mg/kg de pentobarbital de sódio e 0,2 ml de Ketamina (50mg/ml) por via intraperitoneal. Em seguida devem ser posicionados na torre estereotóxica previamente preparada para ocasionar lesões eletrolíticas do núcleo paraventricular bilateralmente (SIMS et al., 1986).

As lesões serão feitas com eletrodos de aço inoxidável de tamanho 00 que, após exposição do cérebro, devem ser posicionados seguindo as coordenadas estereotóxicas: 6.2 mm anterior ao ear bar zero, 3.5 mm dorsalmente a linha interaural e 0.5mm lateral ao seio sagital superior. Depois de posicionar os eletrodos, a lesão deverá ser feita utilizando-se uma corrente de 1mA por 10s e um cátodo retal. As ratas alocadas no grupo controle deverão ser submetidas aos mesmos procedimentos com exceção do posicionamento dos eletrodos no cérebro(SIMS et al., 1986).

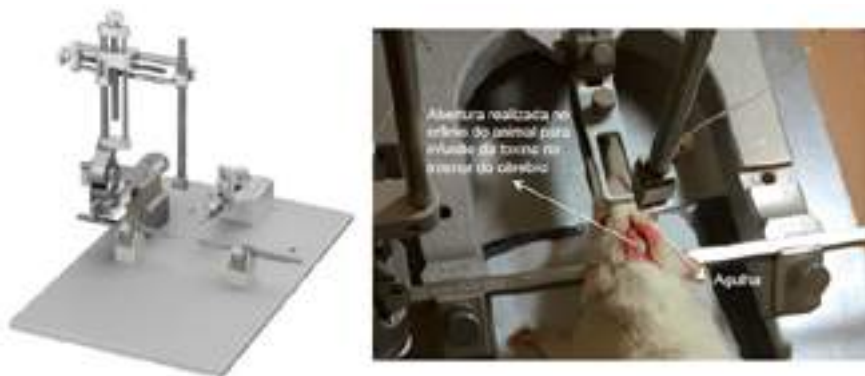


Figura 01: Sistema estereotóxico veterinário para roedores.

Fonte:<http://www.casadaciencia.com>.

br/e-possivel-estudar-a-doenca-de-parkinson-em-animais-em-laboratorio

Finalização: Após os testes, os animais utilizados são submetidos a eutanásia, respeitando os princípios éticos estabelecidos pela legislação vigente.

2.3. INDUÇÃO DA OBESIDADE POR OOFORRECTOMIA BILATERAL

Materiais: Caixa básica de cirurgia.

Animais utilizados: Ratos Wistar isogênicos.

Procedimento: Deve-se dividir ratas Wistar em dois grupos: o grupo 1 e o grupo ooforectomizado. Os animais devem ser separados por sexo, mantidos em ciclo de claro-escuro de 12h, a uma temperatura média de 21°C, com ração e água ad libitum. A remoção das gônadas de ratas Wistar causa queda nos níveis séricos de leptina, relacionando-se com um estado de hiperfagia intensa e aumento do peso corporal dos animais ooforectomizados. Após sete semanas os níveis de leptina se elevam. Este modelo também pode ser utilizado para compreender as alterações fisiológicas ocorridas no período pós-menopausa (VON DIEMEN et al., 2006).

Finalização: Após os testes, os animais utilizados são submetidos a eutanásia, respeitando os princípios éticos estabelecidos pela legislação vigente.

2.4. DIETA HIPERLIPÍDICA DE ENCÉFALO BOVINO NA INDUÇÃO DE OBESIDADE

Materiais: Manteiga sem sal, cérebro bovino, ração comercial padrão e estufa.

Animais utilizados: Camundongos Swiss de 08 semanas de idade.

Procedimento: Antes de completarem 08 semanas de idade, os camundongos devem ser alimentados com dieta comum. Os animais devem ser mantidos a uma temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), com um ciclo claro/escuro de 12h, com ração e água ad libitum. Ao completarem 08 semanas, dividem-se os camundongos em dois grupos: Grupo I (GI) e Grupo Controle (GC). O grupo controle deverá ter acesso livre a ração comercial

comum e água. O grupo I, porém, deverá receber uma dieta hiperlipídica com cérebro bovino acompanhado de água livre (ARAÚJO et al., 2011).

Para a preparação da dieta hiperlipídica deve-se seguir os passos adiante: 1. Descongelar o encéfalo bovino até que atinja temperatura ambiente. 2. Cortarem fatias finas. 3. Secar em estufa a 60°C por 48h. 4. Após desidratados, colocar em um processador alimentar até se obter consistência de farelo. 5. Mistura-se a manteiga sem sal com o farelo de encéfalo bovino aos demais ingredientes, a uma proporção de 14.6% e 40% respectivamente. 6. Recomenda-se que a dieta hiperlipídica seja preparada duas vezes na semana e armazenada no refrigerador a 4°C (ARAÚJO et al., 2011).

Finalização: Os animais devem receber suas respectivas dietas ad libitum por um período de 03 meses. Os parâmetros antropométricos e bioquímicos dos animais devem ser avaliados no início do estudo e em intervalos mensais, até o fim do experimento (ARAÚJO et al., 2011). Após os testes, os animais utilizados são submetidos a eutanásia, respeitando os princípios éticos estabelecidos pela legislação vigente.

2.5. OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA DE SACAROSE EM RATOS

Materiais: Sacarose e ração comercial comum.

Animais Utilizados: Ratos Wistar machos com peso médio de 170 gramas.

Procedimentos: Deve-se dividir os ratos em dois grupos, grupo 1 (G1) e grupo controle (GC). Os animais devem ser mantidos a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), em ciclo claro-escuro de 12h, com ração comercial comum ad libitum. A água oferecida aos animais do G1 deve ser acrescida de sacarose, a uma concentração de 300g/L. Aos animais do GC deverá ser oferecida água sem acréscimos (MALAFAIA et al., 2013).

Finalização: Após os testes, os animais utilizados são subme-

tidos a eutanásia, respeitando os princípios éticos estabelecidos pela legislação vigente.

2.6. MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE POR LEITE CONDENSADO E SACAROSE

Materiais: Sacarose, leite condensado, ração comercial padrão.

Animais Utilizados: Ratos Wistar machos ou fêmeas.

Procedimentos: Os ratos devem ser aleatoriamente alocados em dois grupos: o grupo experimento (GE) e o grupo controle (GC). Ambos os grupos deverão ser mantidos sob temperatura controlada (19-22°C), com um ciclo de claro/escuro de 12/12h, com umidade de 30-40%. Ao GC e ao GE deverá ser oferecido água ad libitum (NADERALI et al., 2001).

O grupo controle deverá ser alimentado com ração comercial padrão e ao grupo experimento deverá ser fornecida a dieta hipercalórica, ambas ad libitum. Para a sua preparação deve-se misturar 33% de ração comercial padrão triturada, 33% de leite condensado, 7% de sacarose e 27% de água (NADERALI et al., 2001).

Finalização: Iniciada dieta hipercalórica os ratos machos devem ser analisados com 16 semanas e as fêmeas com 12 semanas (NADERALI et al., 2001). Após os testes, os animais utilizados são submetidos a eutanásia, respeitando os princípios éticos estabelecidos pela legislação vigente.

2.7. MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE POR DIETA DE CAFETERIA

Materiais: Patê, batata frita, chocolate, bacon, biscoito e ração comercial padrão.

Animais Utilizados: Ratos Wistar machos de 5 semanas de idade.

Procedimentos: Os animais devem ser separados aleatoriamente sob condições controladas de luz (12hrs de claro/escuro) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Os ratos pertencentes ao grupo controle devem ser alimentados com ração comercial padrão, enquanto os animais do grupo experimental devem receber a dieta de cafeteria. Deverá ser oferecido água e ração ad libitum por um período de 65 dias (BERRAONDO et al., 2000; LOPEZ et al., 2003).

A sua preparação consta em alimentos hipercalóricos e hiperlipídicos. Deve-se triturar em processador de alimentos patê, batata frita, chocolate, bacon, biscoito e ração comercial padrão a uma proporção de 2:1:1:1:1:1 (BERRAONDO et al., 2000; LOPEZ et al., 2003).

Finalização: Após 65 dias de alimentação controlada os testes deverão ser realizados. Ao final do experimento, os animais utilizados são submetidos a eutanásia, respeitando os princípios éticos estabelecidos pela legislação vigente.

2.8. INDUÇÃO DA OBESIDADE POR LESÃO ELETROLÍTICA DO NÚCLEO VENTROMEDIAL HIPOTALÂMICO

Materiais: Óleo vegetal, ração comercial padrão, pentobarbital, ketamina.

Animais utilizados: Ratos Wistar.

Procedimento: Divide-se as ratas em dois grupos: grupo controle (GC) e grupo experimento (GE). Cada animal deve ser acomodado individualmente em gaiola de polipropileno, em ambiente com luz (ciclo claro/escuro 12/12horas), temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) controlados, devendo ser oferecido ração comercial padrão e água ad libitum. Antes da cirurgia, a alimentação deverá ser mantida e 24 horas após o procedimento cirúrgico deverá ser disponibilizado dieta hiperlipídica, composta por 67% de ração comercial padrão e 33% de óleo vegetal (peso/peso)(SIMS et al., 1986).

Para o procedimento cirúrgico os ratos devem ser anestesiados com 35mg/kg de pentobarbital de sódio e 0,2 ml de Ketamina (50mg/ml) por

via intraperitoneal (SIMS et al., 1986). Em seguida devem ser posicionados na torre estereotáxica previamente preparada para ocasionar lesões eletrolíticas do núcleo ventromedial hipotalâmico bilateralmente (VON DIEMEN et al., 2006; DUBE et al., 1999).

As lesões serão feitas com eletrodos de aço inoxidável de tamanho 00 que, após craniotomia, devem ser posicionados seguindo as coordenadas estereotáxicas: 5 mm acima da linha interaural, 0,6mm lateral ao bregma e 9 mm abaixo do crânio. Depois de posicionar os eletrodos, a lesão deverá ser feita utilizando-se uma corrente de 1.2 mA por 4s por três vezes com intervalos de 30s(VON DIEMEN et al., 2006; DUBE et al., 1999). As ratas alocadas no grupo controle deverão ser submetidas aos mesmos procedimentos com exceção do posicionamento dos eletrodos no cérebro(SIMS et al., 1986).

Finalização: Após os testes, os animais utilizados são submetidos a eutanásia, respeitando os princípios éticos estabelecidos pela legislação vigente.

Modelos experimentais de obesidade em murinos

Autor	Método	Resultados
Hernandez-Bautista et al., 2014	Indução da obesidade por lesão do núcleo hipotalâmico ventromedial pela administração de glutamato monossódico.	Foi observado aumento gradual de peso do grupo controle e do grupo experimento. Contudo o aumento de peso do grupo experimento foi significativamente maior do que o grupo controle. Aos 4, 8, 12 e 16 meses de idade, foi observado aumento de 20%, 42%, 36% e 20% do peso das ratas e 18%, 51%, 23% e 21% do peso dos ratos respectivamente.

SIMS et al., 1986	Indução da obesidade por lesão do núcleo paraventricular hipotalâmico.	Os animais com lesões simétricas no núcleo paraventricular apresentaram obesidade significativa quando comparados ao grupo controle ($P < 0,02$). O peso dos animais não diferiam entre si antes da cirurgia, porém, a partir do 9º dia pós-operatório, os animais submetidos as lesões eletrolíticas cerebrais apresentaram diferença de peso com significância estatística em relação ao grupo controle, mantendo-o até o fim do experimento ($P < 0,05$).
Von Diemen et al., 2006	Indução da obesidade por ooforectomia bilateral.	A remoção dos ovários causou a diminuição dos níveis iniciais de leptina ocasionando hiperfagia e aumento de peso. Logo, após 7 semanas da ooforectomia os níveis séricos de leptina subiram ainda mais.
Araújo et al., 2011	Dieta hiperlipídica de encéfalo bovino na indução de obesidade.	O peso corporal do grupo que recebeu a dieta hiperlipídica acrescida de cérebro bovino, aumentou 28% e 25% no segundo e terceiro mês respectivamente quando comparado ao grupo controle ($P < 0,01$). Os animais alimentados com a dieta hiperlipídica apresentou percentual de ingestão menor que o controle. Porém, o percentual de energia ingerida foi maior ocasionando acúmulo no tecido adiposo. Após 3 meses, o peso da gordura periepididimal e da gordura retroperitoneal estava significativamente maior que a do grupo controle ($P < 0,01$).
Malafaia et al., 2013	Obesidade induzida por dieta hipercalórica de sacarose em ratos.	Quando comparados, os grupos controle e experimental apresentaram diferença importante de peso entre o 14º e 78º dia indicando o efeito positivo da sacarose no aumento do peso. Além disso o grupo tratado com sacarose apresentou maior concentração de gordura epididimal e retroperitoneal, porém sem diferença estatística no índice de Lee.

Naderali et al., 2001	Modelo experimental de obesidade por leite condensado e sacarose.	Após 4 semanas de dieta os animais alimentados com leite condensado e sacarose ganharam mais peso que aqueles alimentados apenas com ração comercial padrão ($P < 0,01$). O aumento do peso corporal dos ratos foi significativamente maior do que o das fêmeas quando comparados com o grupo controle. A gordura epididimal e perirrenal foi 200% maior ($P < 0,001$) enquanto o peso do músculo gastrocnêmico significância estatística. Todos os animais tratados com a dieta hipercalórica apresentaram maior concentração sérica de triglicérides (15-80%; $P < 0,001$) e maior concentração sérica de leptina. Não houve diferença dos níveis séricos de insulina e de glicose entre os 2 grupos.
Berraondo et al., 2000; Lopez et al., 2003	Modelo experimental de obesidade por dieta de cafeteria.	Quando comparados ao grupo controle, os animais submetidos a alimentação com a dieta de cafeteria por 75 dias apresentaram aumento do peso corporal final ($P < 0,01$), aumento do percentual de tecido adiposo corporal ($P < 0,001$) e aumento da concentração sérica de ácidos lipídicos (+22%).
Dube et al., 1999	Indução da obesidade por lesão eletrolítica do núcleo ventromedial hipotalâmico.	Os animais do grupo submetido a lesão eletrolítica do núcleo ventromedial hipotalâmico ganharam mais peso do que aqueles do grupo controle ($P < 0,05$). Não foi constatado alteração nos níveis de insulina. Porém, os níveis séricos de leptina aumentaram progressivamente durante os primeiros 21 dias do pós-operatório.

Tabela 01: Principais modelos experimentais de indução de obesidade em murinos

REFERÊNCIAS

- AFSHIN A, FOROUZANFAR MH, et al. **Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years.** *N Engl J Med* 2017; 377:13.
- ARAÚJO, T. G. et al. **High-fat diet based on dried bovine brain: an effective animal model of dyslipidemia and insulin resistance.** *J. Physiol. Biochem.* 67, 371–379 (2011).
- BERRAONDO B, MARTINEZ JA. **Free fatty acids are involved in the inverse relationship between hormone-sensitive lipase (HSL) activity and expression in adipose tissue after high-fat feeding or beta3-adrenergic stimulation.** *Obes Res.* 2000; 8:255–61.
- BRAY GA, FRÜHBECK G, RYAN DH, WILDING JP. **Management of obesity.** *Lancet* 2016; 387:1947.
- BRAY GA, RYAN DH. **Medical therapy for the patient with obesity.** *Circulation* 2012; 125:1695.
- GALLAGHER D, VISSER M, SEPÚLVEDA D, et al. **How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex, and ethnic groups?** *Am J Epidemiol* 1996; 143:228.
- HERNÁNDEZ-BAUTISTA RJ, ALARCÓN-AGUILAR FJ, DEL C ESCOBAR-VILLANUEVA M, et al. **Biochemical alterations during the obese-aging process in female and male monosodium glutamate (MSG)-treated mice.** *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):11473–11494.
- JENSEN MD, RYAN DH, APOVIAN CM, et al. **2013 AHA/ACC/TOS Guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association.** Task Force on Practice. Guidelines and The Obesity Society. *Circulation* 2014; 129:S102.
- KAPLAN LM, GOLDEN A, JINNETT K, et al. **Perceptions of Barriers to Effective Obesity Care: Results from the National ACTION Study.** *Obesity (Silver Spring)* 2018; 26:61.
- LÓPEZ, I. P., MARTI, A., MILAGRO, F. I. et al., “**DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats,**” *Obesity Research*, vol. 11, no. 2, pp. 188–194, 2003.
- MALAFAIA, ANDRESSA BRESSAN et al. **Obesity induction with high fat sucrose in rats.** *ABCD, arq. bras. cir. dig.*, São Paulo, v. 26, supl. 1, p. 17-21, 2013.
- MEI Z, GRUMMER-STRAWN LM, PIETROBELLI A, et al. **Validity of body mass index compared with other body-composition screening indexes for the assessment of body fatness in children and adolescents.** *Am J Clin Nutr* 2002; 75:978.
- NADERALI, E. K., BROWN, M. J., PICKAVANCE, L. C., WILDING, J. P. H., DOYLE, P. J., AND WILLIAMS, G. (2001). **Dietary obesity in the rat induces endothelial dis-**

function without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. Clin. Sci. 101, 499–506.

SIMS JS, LORDEN JF. **Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels.** Behav Brain. Res. 1986;22:265–281.

STRAUSS RS, POLLACK HA. **Epidemic increase in childhood overweight, 1986-1998.** JAMA 2001; 286:2845.

VON DIEMEN, V; TRINDADE, E N; TRINDADE, MACIEL, M R. **Experimental model to induce obesity in rats.** Acta Cir. Bras., São Paulo, v. 21, n. 6, p. 425-429, Dec. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.** Tech Rep Ser 2000; 894:i.

CAPÍTULO 2

MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO DE DIABETES MELLITUS

Thayane Araújo Lima

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença endócrina que se caracteriza por um quadro de hiperglicemia persistente resultante da deficiência absoluta ou relativa na secreção e/ou ação da insulina pela célula beta pancreática (AHMAD et al., 2014).

Apesar dos êxitos obtidos por meio do avanço da medicina no tratamento intensivo com a insulina, lamentavelmente o diabetes ainda é, hoje, uma das principais causas de incapacitação física para o trabalho, tornando o seu portador 25 vezes mais propenso à cegueira, 17 vezes mais susceptível à nefropatia, com chances cinco vezes maiores de uma amputação de membros e o dobro de risco de uma doença cardiovascular (LA PORTE et al., 1985; KRÓLEWSKI et al., 1987).

A hiperglicemia persistente no DM leva a complicações microvasculares, predominando a retinopatia, nefropatia e neuropatias debilitantes, e a complicações macrovasculares, como o acidente vascular cerebral, doenças que afetam artérias que suprem o coração, cérebro e extremidades inferiores. (RIBEIRO et al., 2007).

Diante dessa realidade, torna-se imprescindível a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes e de suas complicações, à procura de um tratamento capaz de contribuir às alterações endócrino-metabólicas causadas pela doença e, principalmente, as lesões crônicas sobre os diferentes órgãos (LERCO et al., 2003).

Assim, os modelos experimentais em animais têm ganhado bastante destaque na obtenção do esclarecimento sobre esta doença. Por isso, a experimentação animal tem uma longa história no campo da pesquisa sobre diabetes (REES et al., 2005).

O objetivo deste estudo é destacar a importância dos modelos expe-

rimentais de indução do Diabetes Mellitus em animais de laboratório e descrevê-los, visando à descoberta de medicamentos e tratamentos específicos para controle desse efeito metabólico.

2. MODELOS DE INDUÇÃO DE DIABETES MELLITUS

2.1 INDUÇÃO POR ALOXANA

Materiais: Gaiola metabólica, solução aquosa de aloxana a 2%, caixa aquecida com lâmpada elétrica, gaiola individual e agulhas de calibre 13 x 4,5 mm.

Animais utilizados: Ratos Wistar (figura 02).



Figura 02: Rato Wistar.

Fonte: http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&id_serv=14

Procedimento: O animal é colocado em gaiolas metabólicas indivi-

duais de jejum alimentar por 24 horas, com fornecimento de água por todo esse tempo. A seguir, cada rato deve ser colocado em uma caixa aquecida com lâmpada elétrica, durante um período de aproximadamente 10 minutos (tempo necessário para uma boa visualização das veias da cauda). Após esse procedimento, o animal deve ser contido em uma pequena gaiola individual, tendo sua cauda exposta, para a inoculação da droga por meio de agulhas de calibre 13 x 4,5 mm (Figura 03).

A dose mais frequentemente utilizada em ratos é de 42 a 65mg/ kg por via intravenosa, por meio da veia peniana ou veia da cauda (CARVALHO et al., 2003; LERCO et al., 2003). No entanto, pesquisadores utilizam doses mais elevadas, de 120mg/kg pela mesma via ou pela via intraperitoneal e doses de 150mg/Kg intraperitoneal (SILVA et al., 2015).

Decorridos 30 minutos do tratamento, os animais são alimentados normalmente. No final do procedimento, há a contabilização do peso do animal em gramas, da ingestão hídrica de 24h em mililitros, da ingestão alimentar de 12h em gramas e da diurese de 24h em mililitros.



Figura 03: A: animal sob controle clínico em gaiola metabólica; B: ratos em caixas aquecidas para obtenção de sangue; C: imobilização da cauda do animal em caixa individual; D: secção da cauda e coleta de sangue.

Fonte: LERCO et al., 2003.

Finalização dos casos: A aloxana pode ser utilizada de forma segura na experimentação animal em ratos. No entanto, um monitoramento intensivo da temperatura corporal, hipoglicemia e hiperglicemia na primeira semana após indução (figura 04) é extremamente importante para conseguir o maior número de animais diabéticos com menor incidência de óbito (SILVA et al., 2015).



Figura 04: Incisão em uma veia da cauda para determinação do nível de glicemia 10 dias após a injeção de aloxana à nível de monitoramento.
Fonte: CARVALHO et al., 2003.

2.2. INDUÇÃO POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ)

Materiais: Balança comum e de precisão (figura 05), gaiolas com espaço para quatro animais cada, dispositivo com controle eletrônico de temperatura, tampão citrato (figura 06), fármacos para anestesia local (xilazina e ketamina), seringa com agulha de 1 mL, estreptozotocina (figura 06) e gaiola metabólica.

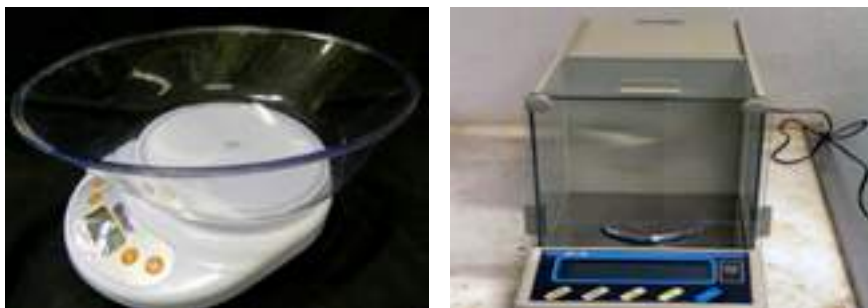


Figura 05: Balança comum e de precisão para pesagem do animal e da estreptozotocina, respectivamente.
Fonte: ARAÚJO et al., 2010.



Figura 06: Estreptozotocina e tampão citrato
Fonte: ARAÚJO et al., 2010.

Animais utilizados: Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) (figura 02).

Procedimento: Primeiramente, os ratos devem passar por um período de adaptação de três dias para então serem enumerados e divididos em gaiolas contendo quatro animais cada. Neste período, podem ser alimentados com ração sólida e água ad libitum. Tendo temperatura controlada de 22 °C durante todo o dia, mantida através de equipamentos de ar condicionado e iluminação feita tanto artificialmente como à luz natural com limpeza das gaiolas frequentemente (ARAÚJO et al., 2010).

Os animais devem ser privados de alimentação sólida por um período de 14 a 16 horas prévias à administração da estreptozotocina (STZ) e man-

tidos apenas com água. Nesse primeiro momento, eles devem ser pesados para verificação do peso inicial. A STZ deve ser titulada e administrada em dose única na proporção de 35 mg para cada 1000g de peso corporal e dissolvida em tampão citrato 0,01M e pH 4,5 (sendo 0,2ml de solução para inoculação para cada animal) (ARAÚJO et al., 2010).

Em um segundo momento, eles devem ser anestesiados através da aplicação de 15 mg/Kg de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Xilazina), substância com propriedades sedativas e analgésicas, além de relaxante muscular, e 38,5 mg/kg de Ketamina base a 10% (figura 07). Assim, os animais devem ser contidos em decúbito dorsal para receber a injeção intravenosa (veia dorsal do pênis) da STZ através de seringa de 1 ml e agulha curta fina após a manipulação e exposição da área de aplicação (figura 08). Após isso, eles podem ser recolocados em suas respectivas gaiolas e observados até o final do período de analgesia, de aproximadamente 30 a 120 minutos (ARAÚJO et al., 2010). Nesse momento, a gaiola metabólica mostra-se bastante útil para determinação dos ganhos e perdas do animal.



Figura 07: Aplicação do analgésico por via intraperitoneal.
Fonte: ARAÚJO et al., 2010.

Finalização dos casos: Nota-se que os sintomas se mostram bem evidentes, com aumento do volume urinário e fecal, irritabilidade, polidipsia e polifagia. Já que em três dias, a estreptozotocina faz o pâncreas edemaciado e, por fim, causa degeneração nas células beta das ilhotas de Langerhans, induzindo o Diabetes Mellitus experimental (AKBARZADEH et al., 2007).



Figura 08: Introdução da droga na veia dorsal peniana do animal.
Fonte: ARAÚJO et al., 2010.

2.3. INDUÇÃO POR PANCREATECTOMIA PARCIAL

Materiais: Fármacos para anestesia local (ketamina e xilazina), algodão esterilizado, dieta com 40% de gordura, medidor de glicose, balança comum para peso corporal e kits de radioimunoensaio comercial.

Animais utilizados: Ratos Sprague Dawley.

Procedimento: Os ratos devem ser anestesiados com ketamina e xilazina (100 e 5 mg /kg de peso corporal) e 90% de seu pâncreas deve ser removido usando a técnica de Hosokawa para gerar ratos Px (HOSOKAWA et al., 1996). O tecido pancreático dentro 2 mm do ducto biliar comum e

estendendo-se desde o ducto para a primeira parte do duodeno permanece e o pâncreas residual é anatomicamente bem definido.

Após a cirurgia, os animais podem ter acesso livre a ração de laboratório normal com dieta com 40% de gordura e água da torneira por duas semanas. (CHOI, 2004). Após a primeira semana pós-operatória, o peso corporal, os valores de glicose plasmática coletados através das pontas dos ratos e as concentrações insulínicas, através de kits de radioensaio comercial (CHOI et al., 2004), devem ser verificados diariamente por intervalos semanais por 6 semanas (BONNER-WEIR et al., 1983).

Finalização dos casos: No final de período de recuperação de duas semanas, pós-operatório, aqueles com nível de glicose no sangue inferior a 9,4 mmol/L são abatidos entre os ratos Px (CHOI et al., 2004).

2.4. INDUÇÃO POR DIETA HIPERLIPÍDICA

Materiais: Gaiolas plásticas de dimensão 45x30x15 cm, dispositivo com controle eletrônico de temperatura, dieta hiperlipidêmica, balança eletrônica e medidor de glicose.

Animais utilizados: Ratos Wistar.

Procedimento: Os animais devem ser dispostos em gaiolas plásticas coletivas de dimensão 45x30x15 cm contendo, no máximo, cinco animais por 20 dias para adaptação do ambiente, com oferta de ração padrão e água ad libitum, com temperatura mantida em $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às sete horas da manhã (BALLESTRERI et al., 2015).

Eles devem passar por um período de 120 dias a base de dieta hiperlipidêmica (consistindo em uma mistura de alimentos hipercalóricos na seguinte proporção: 15g de ração padrão (3,78kcal/g); 10g de amendoim torrado (5,95 kcal/g); 10g de chocolate ao leite (5,4 kcal/g) e 5g de bolacha maizena (4,25 kcal/g), contendo por peso 20% de proteína, 48% de carboidrato, 20% de lipídeos, 4% de celulose, 5% de vitaminas e minerais). Devem ter seu peso glicêmico e corporal controlados por amostras de

sangue coletadas através de pequena incisão da ponta da cauda dos ratos utilizando o medidor de glicose e por balança eletrônica, respectivamente (BALLESTRERI et al., 2015).

Finalização dos casos: Após coleta do material necessário, recomenda-se que os animais sejam sacrificados por decapitação em guilhotina sem anestesia prévia ao final dos 120 dias de tratamento (BALLESTRERI et al., 2015).

2.5. INDUÇÃO POR ADMINISTRAÇÃO PARENTERAL DE NITRILOTRIACETATO FÉRRICO

Materiais: Injeções intraperitoneais, solução preparada de nitrilotriacetato, glicosímetro sérico e urinário.

Animais utilizados: Ratos Wistar ou coelhos albinos.

Procedimento: Eles devem receber injeções intraperitoneais diárias (i.p.) de Fe⁺³-NTA na seguinte sequência: 0,2 mg Fe/100 g de peso corporal por dia durante 3 semanas; 0,6 mg Fe/100 g de peso corporal por dia durante as 3 semanas seguintes e 1,0 mg de Fe/100 g de peso corporal diariamente durante os 2 meses restantes, sendo uma quantidade total de ferro administrada a cada animal de aproximadamente 200 mg (AWAI et al., 1979; MAY et al., 1980).

Para a preparação de Fe⁺³-NTA, o nitrato férrico deve ser dissolvido em 1,0 N de HCl e para produzir a solução Fe⁺³-NTA, 162 ml de 0,1M de solução de nitrato férrico deve ser adicionado a 100 ml de 0,08M de nitrilotriacetato dissódico e o pH deve ser ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio pó sob agitação magnética, sendo a mistura preparada imediatamente antes da utilização (AWAI et al., 1979; MAY et al., 1980). A coleta de glicemia sérica e urinária deve ser realizada duas vezes por semana.

Finalização dos casos: Há o inferimento que as perturbações no metabolismo do ferro ou a deposição excessiva de ferro nas ilhotas pancreáticas é a causa diabetes na hemocromatose, manifestando sintomas

diabéticos, tais como, hiperglicemia, glicosúria, cetonemia e cetonúria, após aproximadamente 60 dias de tratamento (AWAI et al., 1979; MAY et al., 1980).

3. DISCUSSÃO

Modelos experimentais em animais têm contribuído significativamente para o estudo do diabetes mellitus, pois devido às limitações encontradas nos estudos com seres humanos torna-se necessário a exemplificação em modelos experimentais para dar oportunidade aos pesquisadores de controlar *in vivo* o ambiente genético e fatores ambientais que podem influenciar o desenvolvimento da doença e o estabelecimento de suas complicações (CHATZIGEORGIOU et al., 2009), e assim ganhar novas informações sobre seu manejo e tratamento em humanos.

A maioria das experiências é realizada em roedores, embora outras espécies com características biológicas humanas são também utilizadas (REES et al., 2005). Modelos animais desenvolvem diabetes espontaneamente ou usando produtos químicos, cirúrgicos e genéticos, o que facilita a descrição das características clínicas ou fenótipos da doença, permitindo aos pesquisadores o conhecimento de técnicas de tratamento que possam ser utilizadas.

Assim, foram descritos cinco principais modelos experimentais utilizados em animais para induzir a patologia diabética, a partir da exposição dos materiais necessários, do animal a ser utilizado no modelo, do procedimento propriamente dito e da finalização do caso, a fim de facilitar o entendimento do leitor que executará tal modelo.

Tendo o cuidado de que todos os pesquisadores devem sempre ter em mente os limites éticos no uso de modelos animais de acordo com os Princípios Éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação para seus experimentos, na utilização dos animais somente quando são indispensáveis para um estudo e evite causar-lhes dor, angústia, sofrimento e danos permanentes (GUI et al., 2004).

4. CONCLUSÃO

Os modelos experimentais apresentam enorme importância nas possíveis descobertas de tratamento das doenças humanas, assim como na diabetes mellitus especificado nesse capítulo. Por isso, torna-se o exercício deste, de forma correta, essencial para a pesquisa e para o esclarecimento de novas abordagens terapêuticas.

REFERÊNCIAS

AHMAD, K. **Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus.** Journal of Traditional Chinese Medicine, Pakistan, v. 34, n. 2, p. 234-237, 2014.

AKBARZADEH, A.; NOROUZIAN, D.; MEHRABI, MR et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem* (2007) 22: 60.
ARAÚJO, T. M.V. **Descrição do método de indução de diabetes mellitus para testes de novas drogas e procedimentos específicos.** Trabalho de conclusão de curso. São Paulo. 2010.

AWAI, H.; NARASAKI, H.; YAMANOI, Y.; SENO, S. **Indução de diabetes em animais por administração parenteral de nitrilotriacetato férrico. Um modelo de hemocromatose experimental.** *Sou J Pathol.* 1979 Jun; 95 (3): 663-73.

BALLESTRERI, E.; MARCON, I.F.; TAVARES, R.G. **Comparação De Modelos De Indução Da Síndrome Metabólica: Dieta Com Excesso De Frutose E Dieta Hiperlipidêmica.** *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento.* São Paulo. v.9. n.51. p.96-104.

BONNER-WEIR, S.; TRENT, D.F.; WEIR, G.C. **Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release.** *J Clin Invest.* 1983 Jun; 71(6): 1544–1553.

CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. **Modelo experimental de indução do diabetes mellitus em ratos.** *Acta Cir. Bras.,* São Paulo , v. 18, n. spe, p. 60-64, 2003.

CHATZIGEORGIOU et al. **Animal Models of Diabetes: a Synopsis (Review).** Department of Experimental Physiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece in vivo 23: 245-258 (2009).

CHOI, B.; PARK, C. H.; CHOI, M.K.; JUN, D. W.; PARK, S. **Improvement of Insulin**

Resistance and Insulin Secretion by Water Extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% Pancreatectomized Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (11), 2257–2264, 2004.

GUI, M. K.; ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, J. E. et al. **Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação.** São Paulo: UNIFESP; 2004.

HOSOKAWA, Y. A.; HOSOKAWA, H.; CHEN, C.; LEAHY, J. L. **Mechanism of impaired glucose-potentiated insulin-secretion in diabetic 90 percent pancreatectomy rats — Study using glucagon-like peptide-1 (7-37).** *J. Clin. Invest.*, 97, 180–187 (1996).

KIRSTEN, V.R.; SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D. **Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1.** Revisão. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2010;43(1):3-10.

KRÓLEWSKI, A.S.; WARRAM, J.H.; RAND, L.I.; KANN, C.R. **Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications.** *N Engl J Med* 1987;317:1390-8.

LA PORTE, R.E. **Cruickshanks: incidence and risk factors for insulin-dependent diabetes.** In: Harris MI, Hamman RF. *Diabetes in America.* Washington: National Diabetes Data Group, Niaddk/US Dept Health and Human Services; 1985. p. 1-12.

LEITER E.H.; HERRATH, M.V. **Animal models have little to teach us about Type 1 diabetes: 2. In opposition to this proposal.** *Diabetologia.* 2004; 47: 1657-60.

LERCO, M.M.; SPADELLA, C.T.; MACHADO, J.L.M.; SCHELLINI, S.A.; PADOVANI, C.R. **Caracterização de um modelo experimental de Diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos: Estudo clínico e laboratorial.** *Acta CirBras [serial online]* 2003 Mar-Abr;18(2).

MAY, M.E.; PARMLEY, R.T.; SPICER, S.S.; RAVENEL, D.P.; MAY, E.E.; BUSE, M.G. **Iron nitrilotriacetate--induced experimental diabetes in rats.** *J Lab Clin Med.* 1980 Apr;95(4):525-35.

OLIVEIRA C. A. M.; LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. **Características do diabetes mellitus induzido pela administração neonatal de aloxana em ratos.** *Bioscience Journal, Uberlândia*, v.20, n.2, p.93-102, 2004.

REES, D. A., ALCOLADO, J. C. **Animal models of diabetes mellitus.** *Diabetic Medicine*, 22(4), 359–370. 2005.

RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, C.A.M.; MELLO, M.A.R. **Exercício e prevenção do diabetes mellitus: importância do modelo experimental utilizando ratos.** *Motriz.* 2007;13(1):72-7.

RIBEIRO, C.; VOLTARELLI, F. A.; MOTA, C. A.; OLIVEIRA, C. A. M.; MELLO, M. A. R. **Evolução do diabetes mellitus em ratos neonatos tratados com aloxana.** In: congresso latinoamericano e iberoamericano de ciências fisiológicas, 22., 2006, Buenos Aires. *Physiological mini- reviews.* p.192.

SILVA, V.D.; NOGUEIRA, R.M.B. **Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar.** *Ver CiêncFarm Básica Apl.*, 2015;36(1):9-15.

CAPÍTULO 3

MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO E CICATRIZAÇÃO

*Hianny Ribeiro Cabral
Paulo Roberto da Silva Júnior*

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem se observado uma grande evolução e solidificação no cotidiano clínico do emprego da técnica de cicatrização e tratamento de feridas com o uso de novas tecnologias (KREISNER et al., 2005).

No entanto, apesar do uso de técnicas cada vez mais promissoras, em algumas delas alguns pontos ainda não foram totalmente esclarecidos sobre a efetividade, vantagens e desvantagens do emprego das técnicas, e o quanto elas podem ser consideradas confiáveis visando a recuperação de pacientes com feridas de etiologias variadas (KREISNER et al., 2005).

A cicatrização de uma lesão tecidual não pode ser vista como um processo isolado, mas sim uma série complexa de eventos biológicos que ocorrem de forma simultânea com o objetivo final de preservar a vida (KREISNER et al., 2005).

Corresponde a uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares, interagindo na busca pela repavimentação e reconstituição tecidual, envolvendo, para isto, fenômenos bioquímicos e fisiológicos. Para que haja o processo de cicatrização, houve primeiramente um evento danoso, que por sua vez ocasionou algum grau de perda tecidual que, de acordo com sua intensidade e amplitude, pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou, ainda, atingir o órgão chegando ao tecido celular subcutâneo (MANDELBAUM et al., 2003).

O objetivo deste estudo é destacar a importância dos modelos experimentais de indução de inflamação em animais de laboratório visando a

descoberta de medicamentos e tratamentos específicos para controle de inflamação e promoção da cicatrização.

2. MODELOS DE INDUÇÃO DE INFLAMAÇÃO E CICATRIZAÇÃO

2.1. INDUÇÃO DE QUEIMADURA POR ALTA TEMPERATURA

Materiais: Anestésico local; água quente (acima de 100°C); material para excisão cirúrgica da pele; marcador cirúrgico estéril; placa de cobre para aquecimento; dispositivo com controle eletrônico de temperatura.

Animais utilizados: ratos Wistar

Procedimento: A queimadura da pele dorsal pode ser obtida através da colocação de água quente, acima de 100°C, durante o período de 10 segundos, compreendendo uma área de 30% da superfície corporal do animal. Através deste procedimento podem ser obtidas tanto amostras de pele sadia quanto de pele queimada (BARBOSA et al., 2003).

Outra forma de indução de lesões relacionadas a queimadura da pele, agora com diferentes temperaturas, é através da separação da área dorsal dos animais em 2 quadrados medindo 10x10 mm foram delineados com um marcador cirúrgico estéril em cada lado e ao longo da coluna vertebral e posicionados entre os membros anteriores e posteriores, utilizando um molde previamente preparado. Através deste procedimento podem ser obtidas queimaduras com diferentes temperaturas (CAMPELO et al., 2011).

Neste procedimento, as queimaduras são obtidas com a aplicação de 1 placa de cobre, ligada a um dispositivo de controle eletrônico de temperatura, na pele dorsal de ratos anestesiados (CAMPELO et al., 2011).

Finalização dos casos: Após coleta do material necessário, recomenda-se a eutanásia do animal, que pode ser realizada através da técnica de punção aspirativa exsanguinante da aorta abdominal (BARBOSA et al., 2003).

No entanto, conforme o caso, pode-se obter uma analgesia foi obtida durante 24 horas após a queimadura por adição de 30mg de fosfato hemi-hidratado de codeína a 500 ml de água potável, com posterior tratamento das feridas (BARBOSA et al., 2003).

2.2. INDUÇÃO QUÍMICA DE INFLAMAÇÃO EM PATA POR CARRAGENINA

Materiais: Carragenina, seringa e agulha, hidropletismômetro elétrico.

Animais: Ratos Wistar.

Procedimento: As substâncias a serem testadas são administradas por via oral, uma hora antes da injeção intraplantar de carragenina (1mg, 100µl). O volume da pata é medido 1, 2, 3 e 4 h após a injeção do estímulo indutor da inflamação, com auxílio de um hidropletismômetro elétrico, aparelho que mede o volume de líquido deslocado e o traduz de forma digital. Os resultados são apresentados como a variação do volume da pata (mL) em relação aos valores basais. Após a determinação do volume basal, os animais são divididos em grupos experimentais, de tal modo que os volumes médios dos diferentes grupos sejam semelhantes (BOLETIM TÉCNICO, 2014).

Finalização: Eutanásia dos animais.

2.3. INDUÇÃO DE ULCERA GÁSTRICA POR ETANOL

Materiais: Carbenoxolona ou nerol, seringa e agulha e etanol.

Animais: Ratos Wistar.

Procedimento: Os animais são submetidos a 18 horas de jejum, sendo logo em seguida tratados por via oral com veículo, carbenoxolo-

na (100 mg/Kg) ou Nerol nas doses de 15, 30 ou 60 mg/Kg. Uma hora após os pré-tratamentos, administra-se 1 ml de etanol absoluto por via oral (ANGELIS et al., 2012). Já com 1 hora após procedimento, observa-se quadro de gastrite e ulceração gástrica.

Finalização: Uma hora após receberem o etanol, os animais podem ser eutanasiados (ANGELIS et al., 2012).

2.4. INDUÇÃO DE FERIDA POR LESÃO MECÂNICA

Materiais: Fármaco pré-anestésico e anestésico, agulha e seringa, PVPI para antisepsia local, solução de NaCl, cabo de bisturi, lâmina de bisturi e pinça cirúrgica.

Animais: Coelhos Nova Zelândia

Procedimento: Os animais devem submetidos à anestesia geral para a realização das feridas. Para tanto, deve-se utilizar como medicação pré-anestésica cloridrato de quetamina 8mg kg⁻¹, IM, midazolam 0,8mg kg⁻¹, IM e citrato de fentanila 0,015mg kg⁻¹, IM, indução e manutenção anestésica com isoflurano vaporizado em O₂ 100%. Após antisepsia, deve-se realizar a remoção de um retalho de pele e tecido subcutâneo de 1 cm² do lado direito e outro do esquerdo, caudal à borda da escapula, a 1cm da coluna vertebral. No pós-operatório imediato, as feridas são medidas com paquímetro, cobertas por gaze estéril e mantidas com atadura elástica. Administra-se cloridrato de tramadol 3mg kg⁻¹, IM, no pós-operatório, BID, por três dias (BEHEREGARAY et al., 2014).

Transcorridas 24 horas da indução de cada lesão, realiza-se a mensuração do comprimento e da largura, com auxílio de paquímetro, seguida pela limpeza de ambas as lesões, com solução de NaCl 0,9%, e então inicia-se o tratamento nas lesões localizadas do lado direito. As lesões do lado esquerdo representam o controle, isto é, desempenhavam apenas o papel de elemento de comparação e, para tanto, o único tratamento que recebem diariamente era a limpeza com solução de NaCl 0,9% (BEHEREGARAY et al., 2014).

Finalização: Eutanásia dos animais.

2.5. INDUÇÃO DE TENDINITE POR COLAGENASE

Materiais: Colagenase, seringa e agulha, bisturi e pinça cirúrgica.

Animais: Equinos.

Procedimento: Os cavalos selecionados devem ser divididos em grupos, caso deseje-se aplicar doses diferenciadas de colagenase. A colagenase deve ser aplicada nos membros torácicos, mais precisamente nos tendões flexores digitais superficiais (TFDS) na dosagem de 1,25mg do produto, correspondente a 0,5mL de solução a 2,50%. Pode-se optar pela administração de uma maior quantidade, conforme as necessidades do estudo a ser realizado (YAMADA et al., 2008).

Antes do protocolo de aplicação da colagenase os cavalos devem ser submetidos à palpação dos tendões flexores digitais superficiais para observação de sensibilidade dolorosa, aumento de volume e temperatura local e ao exame ultra-sonográfico para verificar possíveis alterações que pudessem comprometer as avaliações preconizadas (YAMADA et al., 2008).

Decorridos 7 dias da aplicação, devem ser realizadas incisões percutâneas - splitting - no local da lesão dos membros direitos (grupo tratado), permanecendo os membros esquerdos como grupo controle. Os animais também podem ser divididos em grupos, segundo o período da realização das biópsias (grupo 1 - 30o dia e o grupo 2 - 60o dia após indução da tendinite)(YAMADA et al., 2008).

Finalização: Eutanásia dos animais

2.6. EDEMA DE PATA

Materiais: Carragenina, agulha e seringa, hidropletismômetro para medição do deslocamento de líquido.

Animais: Ratos Wistar.

Procedimento: O edema de pata pode ser induzido por Carragenina na concentração de 1%, administrada no volume de 0,1 ml/animal. O sítio de administração preferencialmente é o coxim plantar da pata traseira do rato, esquerda ou direita. Após aproximadamente 1 hora da aplicação, tem-se o edema de pata bem pronunciado. Este edema pode ser medido através do hidropletismômetro, observando-se o deslocamento de líquido (CONCEIÇÃO et al., 2010).

Finalização: Eutanásia dos animais.

2.7. INDUÇÃO DE LESÃO HEPÁTICA POR INGESTA ESTRITA DE DIETA LÍQUIDA ALCOÓLICA ASSOCIADA A INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE TETRACLORETO DE CARBONO

Materiais: tetracloreto de carbono, seringa e agulha, microscópio ótico para avaliação das lesões.

Animais: Ratos Wistar.

Procedimento: A indução da cirrose com tetracloreto de carbono ocorre através da via intraperitoneal, sendo necessário, em geral, três aplicações por semana, na concentração de 0,15ml/100g de peso vivo, durante períodos variáveis. Após a administração por 8 semanas em ratos, é possível obter também fibrose hepática. Da mesma forma, quando animais são submetidos a inalação de tetracloreto de carbono, em diferentes intervalos de administração (5a, 7a, 9a, 12a e 15a semana) é possível obtenção de cirrose em 100% dos animais entre a 12a e 15a semanas de inalação (PASSOS et al., 2010).

Este modelo de indução é capaz de produzir um padrão histológico mais próximo ao da cirrose humana, com menor mortalidade, maior reprodutibilidade e segurança, apesar do período de indução ser maior (14 semanas). A partir da 5a semana, observa-se o aparecimento de necro-

se hepática difusa associada a esteatose hepatocelular, havendo deposição progressiva de colágeno e fibrose subsequente, atingindo-se o estágio de cirrose hepática micronodular na 15ª semana de inalação. Depois de estabelecido o quadro almejado, os animais devem ser eutanasiados, necropsiados e seus aspectos macroscópicos, microscópicos e bioquímicos mensurados, avaliados e comparados (PASSOS et al., 2010).

Finalização: Os animais devem ser eutanasiados.

2.8. INDUÇÃO DE PANCREATITE AGUDA POR L-ARGININA

Materiais: L-arginina

Animais: Ratos Wistar;

Procedimento: Administração de L-arginina é feita por via intraperitoneal e a gravidade está relacionada com a dose administrada. A lesão inicia com desorganização do retículo endoplasmático e degradação de grânulos de zimogênio e 24 e 48hs após necrose das células acinares. Doses elevadas de L-arginina, como 500mg/100g de peso corporal (i.p.) e mais 3 administrações de 250mg/100g por 10 dias e 350mg/100 g de peso corporal (i.p.) por 1-4 semanas podem ser utilizadas para a indução de pancreatite crônica (SOARES et al., 2013).

Finalização: Recomenda-se a eutanásia dos animais.

2.9. INDUÇÃO DE PERITONITE POR INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE CARRAGENINA

Materiais: Pentobarbital sódico, solução salina estéril, seringa e agulha.

Animais: Camundongos Swiss.

Procedimento: Injeta-se 15mg/kg em 200 microgramas de solução salina estéril na cavidade peritoneal dos camundongos. Decorridas 4 horas do procedimento, os animais são anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg, i.p.) e eutanasiados. Aplica-se então solução salina contendo EDTA e realiza-se massagem suave para liberação do exsudato e para facilitar a coleta do fluido peritoneal objeto do estudo (Adaptado de BATISTA et al., 2016).

Finalização: Eutanásia dos animais com deslocamento cervical (por estarem já sob anestesia geral).

3. CONCLUSÃO

Nos últimos anos tem se observado uma grande evolução e solidificação no cotidiano clínico do emprego da técnica de cicatrização e tratamento de feridas com o uso de novas tecnologias.

No entanto, apesar do uso de técnicas cada vez mais promissoras, em algumas delas alguns pontos ainda não foram totalmente esclarecidos sobre a efetividade, vantagens e desvantagens do emprego das técnicas, e o quanto elas podem ser consideradas confiáveis visando a recuperação de pacientes com feridas de etiologias variadas.

Neste contexto, os procedimentos laboratoriais, caracterizados pela indução de patologias e processo inflamatórios diversos, tem como objetivo a realização de estudos em que a resposta inflamatória e cicatricial precise ser avaliada.

Através deste estudo procurou-se trazer um pouco do que há de consenso sobre as principais técnicas utilizadas para indução de lesões inflamatórias e cicatriciais, sendo estas técnicas consideradas as mais eficientes não somente na obtenção do resultado almejado, mas no menor tempo possível e com o menor sofrimento aos animais estudados, com prioridade sempre para o bem-estar animal e prevenção do sofrimento dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- ABRUCEZE, L.H.B. **Avaliação da eficácia dos biocurativos em ratos Wistar com lesões de pele causadas por queimaduras.** Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 93p., 2013.
- ALVES, A.L.G.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A.; HUSSNI, C.A.; WATANABE, M.J. **Tratamento cirúrgico splitting nas tendinites agudas experimentais em equinos.** Archives of Veterinary Science, 7(2):45-51, 2002.
- ANGELIS, C.D. **Avaliação da proteção gástrica e duodenal do monoterpene nerol em roedores.** Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima, Botucatu. [s.n.], 2012.
- BARBOSA, R.C.C.; GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.C.; CHAVES, C.R.; VASCONCELOS, P.R.L. **Efeitos metabólicos da glutamina em ratos submetidos à queimadura por água fervente (escaldadura).** Acta Cir Brás.;18(6), 2003.
- BATISTA, E.K.F; TRINDADE, H.I.; LIRA, S.R.S.; MULLER, J.B.B.S.; SILVA, L.L.B.; BATISTA, M.C.S. **Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de Luehea divaricata.** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.18, n.2, p.433-441, 2016.
- BEHEREGARAY, G.C.G.; GIANOTTI, G.C.; LEAL, J.S.; GARCEZ, T.; CONTESINI, E.A. **Eletroestimulação na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em coelhos.** Ciência Rural, Santa Maria, 44(5):878-883, maio, 2014
- BOLETIM TÉCNICO. Métodos de avaliação laboratorial da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de produtos naturais.** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária, Boletim técnico nº97, p.1-35, 2014.
- CAMPELO, A.B.B.S.; CAMPELO, M.W.S.; BRITTO, G.A.C.; AYALA, A.P.; GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.L. **An optimized animal model for partial and total skin thickness burns studies.** Acta Cirurgica Brasileira, 26(Suppl. 1), 38-42, 2011.
- CONCEIÇÃO, A.M. **Efeitos antinociceptivo, antiinflamatório e antioxidante da entrecasca da Maytenus rígida Mart. (Celastraceae).** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Sergipe, UFSE, 67p., 2010.
- KREISNER, P.E.; OLIVEIRA, M.G.; WEISMANN, R. **Cicatrização hipertrófica e quelóides: revista de literatura e estratégias de tratamento.** Revista de Cirurgia e Traumatologia Buço-Maxilo-Facial, Camaragibe, 5(1):9-14, jan./mar. 2005.
- MANDELBAUM, S.H.; Di SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. **Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I.** Anais brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro, 78(4):393-410, jul/ago. 2003.
- PASSOS, C.C.; FERREIRA, A.O.; BLAZQUEZ, F.J.H.; GUERRA, R.R. **Modelos experimentais para indução de cirrose hepática em animais: Revisão de literatura.**

Revista Biotemas, 23 (2), junho de 2010.

SOARES, F.S. **Papel da antibioticoterapia na evolução da pancreatite aguda experimental.** Dissertação (Mestrado), UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2013.

YAMADA, A.L.M.; ALVES, A.L.G.; HUSSNI, C.A.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A.; WATANABE, M.J.; CARNEIRO, R. **Comparação de diferentes doses de colagenase em modelo de indução de tendinite para eqüinos: estudo clínico e ultra-sonográfico.** Ciência Rural, 32(3), 2008.

CAPÍTULO 4

MODELOS ANIMAIS DE INDUÇÃO DE INFECÇÕES

Marcella Olímpia Quintino Silva

1. INTRODUÇÃO

O processo infeccioso se dá devido a contaminação de agentes externos podendo ter etiologia bacteriana, viral, fúngica ou parasitária. A maioria desses processos é responsável pelo desenvolvimento de diversas comorbidades se não tratados devidamente (BEINER et al., 2003).

No ambiente hospitalar, a taxa de infecção está relacionada ao tipo e duração do procedimento cirúrgico, comorbidades, estado nutricional e vários outros fatores de risco. A terapia profilática com antibióticos demonstrou claramente diminuir a taxa de infecção após cirurgias. Essas infecções geralmente se manifestam com sinais e sintomas de inchaço e eritema (BEINER et al., 2003).

É imprescindível que se dê a devida atenção aos sinais e sintomas das infecções não só no ambiente hospitalar de alta referência, mas também no atendimento primário. Logo, a atenção primária também é considerada um elemento-chave da assistência à saúde e não deve ser entendida como a antítese da atenção hospitalar, mas sim como uma resposta integrada em todos os níveis do sistema de saúde (PADOVEZE et al., 2014).

Fica claro, portanto, que os avanços alcançados até o momento propiciaram novas opções de tratamento que diminuíram a morbidade e mortalidade de infecções graves. As evidências indicam que abordagens agressivas e precoces associadas ao uso de antimicrobianos representam importantes formas de tratamento (GELAPE et al., 2007).

No entanto, ainda existem infecções que não possuem tratamentos específicos devido às dificuldades de resolução e pesquisa, sendo assim, imprescindível o estudos de modelos experimentais em animais de laboratório para um melhor desempenho futuro na descoberta de medicamentos que possam reverter os processos infecciosos (CORRÊIA et al., 2012).

Como prova disso, sabe-se que um modelo de experimentação animal de qualidade deve ser reprodutível, ser mínimo em variáveis e proporcionar um grande nível de detalhamento sobre um organismo. Grande parte dos conhecimentos científicos para o desenvolvimento tecnológico que o homem adquiriu, visando benefícios à saúde humana e à dos animais domésticos, foi possível, em maioria, graças ao uso dos modelos de experimentação animal. (CORREIA et al., 2012).

Este estudo tem como objetivo ressaltar a importância da indução de infecção em animais de laboratório por meio de modelos experimentais de qualidade tendo em vista a descoberta de medicamentos apropriados assim como tratamentos específicos para os mais diversos tipos de infecções.

2. MODELOS DE INDUÇÃO DE INFECÇÕES

2.1 INDUÇÃO DE PERITONITE POR LIGADURA E PUNÇÃO DO CECO

Materiais: Gaiolas; Cetamina e Xilazina; Tesoura cirúrgica; Instrumentos cirúrgicos esterelizados; Iodopovidínico; Nylon 2-0; Ceftriaxona; Solução de glicose à 25%; Água; Solução salina à 38°C; Seringa de 20ml; Agulha de 25x7mm.

Animais: Ratos Wistar.

Procedimento: Para induzir uma peritonite, primeiramente, os animais devem ser anestesiados com uma injeção intramuscular de 60 mg/kg de cetamina associado a 10 mg/kg de xilazina a 2%. Logo após, realiza-se a ligadura e punção do ceco, nos animais, seguida de uma assepsia com iodopovidínico. (BARBUTO et al., 2014).

Outra forma de indução de peritonite é pela ligadura subtotal do ceco mediante uma pequena incisão mediana de 1cm logo acima da sínfise púbica, utilizando-se a anestesia por via inalatória com éter (SALGADO et al., 2001). Indica-se que os animais estejam em jejum, antes do procedimento cirúrgico, para que se crie um conteúdo intestinal similar (CORREIA et al., 2012). Uma bolsa cecal deve ser colocada, seguida de secção

da parede colônica com tesoura cirúrgica por 0,1 cm fechando, então, o abdômen com nylon 2-0 em uma camada. Após 2h desse procedimento, faz-se a abertura do abdômen e por meio de injeção intramuscular faz-se lavagem salina e antimicrobica com ceftriaxona.

Os animais devem ser observados por 4 horas, em gaiolas separadas, e alimentados com solução de glicose a 25% e água. Após 4 horas o abdômen de todos os animais deve ser reaberto e a cavidade deve ser lavada 3 vezes com solução salina a 38° C por meio de uma seringa de 20 ml, sob pressão (utilizando uma agulha de 25 x 7 mm). O excesso da solução salina deve ser aspirada e a parte necrótica do ceco removida (BARBUTO et al., 2014).



Figura 09: a) Tricotomia da face ventral da região abdominal, seguida de antisepsia com povinilpirrolidona-iodo b) Anestesiados os animais são submetidos a uma laparotomia mediana, pela incisão de aproximadamente dois centímetros no abdômen abrangendo pele, plano músculo-aponeurótico e peritônio, expondo as vísceras abdominais; c) O ceco é cuidadosamente isolado para evitar danos aos válvula ileocecal com obstrução total objetivando aumentar a pressão dentro deste segmento do intestino, sem provocar isquemia, e não permitir o livre trânsito do conteúdo do intestino delgado para o intestino grosso. Após a ligadura, f) o ceco é perfurado conforme a necessidade protocolar com agulha de punção venosa, pres- abdominal, e recolocado no abdome. g). A cavidade abdominal então é fechada

Fonte: ZAPPAROLI et al., 2011.

Finalização: Os animais submetidos a indução por ligadura subtotal tem cerca de 90% de mortalidade até o sétimo dia de pós operatório, associando-se essa porcentagem ao número de punções no ceco e ao calibre da agulha empregada(SALGADO et al., 2001). Todos os animais devem

receber uma dose intramuscular de ceftriaxona durante o segundo procedimento anestésico e 12 h depois (BARBUTO et al., 2014).

2.2. INDUÇÃO DE QUEIMADURA

Materiais: Cloridrato de cetamina e xilazina; Placa de cobre.

Animais: ratos Wistar.

Procedimento: Primeiramente, todos os animais devem receber anestesia geral, podendo ser por meio de injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (90 mg / kg) e xilazina (10 mg/kg) (CAMPELO et al., 2011). A ação anestésica deve ser verificada pela ausência do reflexo de retirada da pata ao estímulo doloroso. (NASCIMENTO et al., 2016). As técnicas utilizadas para gerar superfícies de queima para o modelo experimental podem incluir água aquecida, instrumentos incandescentes e eletricidade (MITSUNAGA et al., 2012).

As queimaduras na pele também podem ser infligidas pela transferência de energia (calor) por condução direta (Cobre/pele) utilizando diferentes temperaturas crescentes (100 °C, 150 °C e 200 °C) por meio uma placa de cobre conectada a um dispositivo eletrônico de controle de temperatura na pele dorsal de ratos anestesiados. A transferência dessa energia térmica por condução de uma estrutura sólida para a superfície da pele não depende da pressão empregada, mas principalmente do gradiente de temperatura entre a pele, a estrutura sólida e a distância entre esses elementos (CAMPELO et al., 2011).

A aparência macroscópica da área de superfície das feridas (Figura 10) não diferem significativamente nas imagens de acordo com as temperaturas de 100°C e 150°C. Entretanto, a aparência macroscópica da superfície da ferida de 200°C mostra-se diferenciada (CAMPELO et al., 2011).

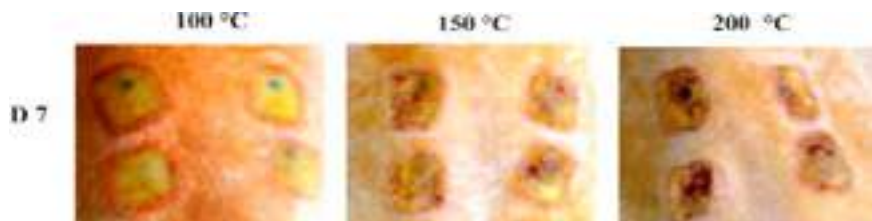


Figura 10: Aparência macroscópica da queimadura no 7º dia após a indução de queimadura em diferentes temperaturas.

Fonte: CAMPELO et al., 2011.

Finalização: No final do procedimento, os animais devem ser devolvidos às suas gaiolas individuais para recuperação com livre acesso a ração para ratos e água da torneira. A analgesia deve ser administrada durante 24 horas após a lesão por queimadura, pela adição de 30 mg de hemi-hidrato de fosfato de codeína a 500 mL de água da torneira. Ao final do experimento os animais devem ser mortos por uma overdose de anestésicos (cetamina + xilazina) (CAMPELO et al., 2011).

2.3. INDUÇÃO DE ENDOCARDITE POR *C. ALBICANS*

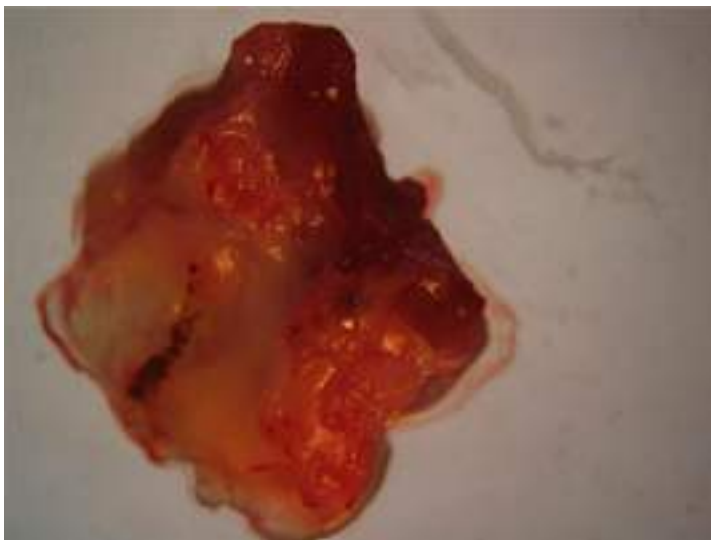
Materiais: Cateter de polietileno (PE10, Clay Adams), zoletil, manômetro, alimentos, água, cateter central, inóculo fresco de *C. Albicans*, cetamina-xilazina.

Animais: Ratos Wistar;

Procedimento: O animal deve ter aproximadamente 3 meses de idade e deve pesar entre 250 e 300mg. Ele será exposto a ciclos de 12-12 horas claro/escuro. Deve ter acesso a alimentos e à água ad libitum. As 24h que antecedem a cirurgia, os animais devem ser mantidos em jejum. Para a indução e manutenção anestésica durante o procedimento cirúrgico o zoletil (tiletamina e zolazepam; Virbac) deve ser administrado na dose de 10 mg por kg de peso corporal. A intervenção é realizada após a assepsia cirúrgica, isolando a artéria carótida e introduzindo um cateter central levando diretamente à valva mitral e ao ventrículo esquerdo (MARCHETTI et al., 2000).

Então, 24 horas depois, aplica-se um inóculo fresco de *C. albicans* através da veia femoral. Um cateter de polietileno (PE10, Clay

Adams) deve ser conectado a um manômetro e inserido no ventrículo esquerdo através da artéria carótida direita, sob anestesia com cetamina-xilazina. O cateter deve ser imobilizado ao longo do experimento para induzir a formação de vegetação trombótica. (DURACK et al., 1972). Após esses procedimentos, o animal deve desenvolver vegetação característica de endocardite infecciosa (figura 11).



i i fi *Staphylococcus aureus*, mostrando a presença de vegetações características de endocardite infecciosa.
Fonte: VICTORIO et al, 2017.

Finalização: O animal deve ser sacrificado 24 h após a administração da última dose no 5º dia da inoculação, e as vegetações devem ser dissecadas, pesadas e homogeneizadas em 1 e 2 mL de solução salina, respectivamente.

2.4. INDUÇÃO DE FERIDA CIRÚRGICA

Materiais: Cloridrato de cetamina 10%; Cloridrato de xilazina 2%; Punch de 12mm²; Caneta Dermográfica; Seringa de insulina de 1ml; Nylon 3.0.

Animais: Ratos Wistar;

Procedimento: Antes do início do experimento, pode haver vermifugação dos animais com Ivermectina a 2% (0,4mg kg⁻¹), administrados por via oral, adicionados em 700mL de bebedouros e repetidos 10 dias antes da cirurgia (MONTEIRO et al., 2016). A cirurgia para a produção da ferida cutânea deve ser realizada no animal sob anestesia por meio da aplicação intraperitoneal de cloridrato de cetamina 10% e de cloridrato de xilazina 2%. Para cada 100g de peso corpóreo, utiliza-se 0,1 mL desse anestésico por meio de seringa de insulina de 1ml (SANTOS et al., 2013).

Pode-se realizar uma ferida cirúrgica circular de cerca de 1,5 cm de diâmetro foi criada por meio da remoção da pele na região dorsal. Uma sutura monofilamentar não absorvível (Nylon 3.0) deve ser utilizada para fechar as bordas da ferida aos músculos adjacentes com pontos separados para minimizar a retração das bordas da ferida (MONTEIRO et al., 2016).

Deve-se realizar uma tricotomia no dorso do animal, e em seguida a incisão cirúrgica feita com um punch de 12mm², utilizando-se a linha média dorsal como referência, e que inclui a epiderme, derme e fáscia dorsal. A profundidade do ferimento da pele deve ser padronizada em função da visualização do planomuscular. É importante a identificação de cada animal na cauda por meio de uma caneta dermatográfica. (SANTOS et al., 2013).

Finalização: Os animais devem ser anestesiados com uma aplicação intraperitoneal de cloridrato de cetamina 10%, e de cloridrato de xilazina 2%, no volume de 0,1ml para cada 100g de peso corpóreo, seguido de aplicação do cloreto de potássio 19,1% (Equiplex) via intracárdica com dose única de 0,4ml para cada 100g de peso corpóreo, concluindo-se assim, o processo de eutanásia (SANTOS et al., 2013).

3. CONCLUSÃO

O estudo dos modelos experimentais é de extrema relevância para o desenvolvimento de técnicas corretas e específicas no tratamento das infecções, como evidenciadas nesse capítulo. Buscou-se, através desse estudo, trazer as principais técnicas utilizadas atualmente para indução de

lesões infecciosas por meio de experimentação animal de qualidade com o intuito de abranger os conhecimentos científicos sobre essas técnicas.

Todos os experimentos citados nesse capítulo visaram aumentar os benefícios acerca dos conhecimentos dos experimentos animais, assim, como, buscaram minimizar o sofrimento deles.

REFERÊNCIAS

BARBUTO, R C et al. **Uso de telas aloplásticas em feridas abdominais de ratos com peritonite induzida**. ABCD, arq. bras. cir. escavação. São Paulo, v. 27, n. 1, p. 26 a 29 de março de 2014.

Beiner, JMMD, Grauer, JMD, Kwon, BKMD e Vaccaro, ARMD (2003). **Infecções pós-operatórias da coluna vertebral**. Neurosurgical Focus FOC; 15 (3), 1-5.

CAMPELO, A P B S et al. **Um modelo animal otimizado para estudos de queima parcial e total da espessura da pele**. Acta Cir. Bras., São Paulo, v. 26, supl. 1, p. 38-42, 2011.

CORRÊA, G. F.; ZAPPAROLI, A. **Modelo Experimental em Roedores – Ligadura e Perfuração Cecal**. Revista Eletrônica de Farmácia Vol. IX (3), 67 - 72, 2012.

GELAPE, C L. **Infecção do sítio operatório em cirurgia cardíaca**. Arq. Bras. Cardiol, São Paulo, v. 89, n. 1, p. e3-e9, July 2007.

MONTEIRO, B S et al. Infusão de células-tronco mesenquimais na cicatrização de pele de ratos wistar imunossuprimidos com dexametasona. Cienc. Rural, Santa Maria, v. 46, n. 10, p. 1824-1829, out. 2016.

NASCIMENTO JUNIOR, B.J. et al. **Estudo da ação da romã (Punica granatum L.) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (Rattus norvegicus)**. Rev. bras. plantas med., Botucatu, v. 18, n. 2, p. 423-432, June 2016 .

PADOVEZE, M C; FIGUEIREDO, R M. **O papel da atenção primária na prevenção e controle de infecções associadas à saúde**. Rev. esc. enferm. USP , São Paulo, v. 48, n. 6, p. 1137-1144, dezembro de 2014.

SANTOS, C. F. F; SANTOS, A. P; MACHADO, T. G. P; AVELAR, C. P; OLIVEIRA, M. X. **Cicatrização de feridas cutâneas em ratos após terapia laser de baixa intensidade (660nm)**. Revista Vozes dos Vales da UFVJM: Publicações Acadêmicas – MG – Brasil –

Nº 03 – Ano II – 05/2013 Reg.: 120.2.095–2011 – PROEXC/UFVJM, 2011.

SALGADO, W; Cunha, FQ;SANKARANKUTY, AS;SANTOS JS.**Development A Model Of Bacterial Peritonites For The Evaluation Of The Treatments Through Laparotomy And Laparoscopy.** Acta Cir. Bras. [online]. 2001, vol.16, suppl.1, pp. 9-12. ISSN 1678-2674

VICTORIO, G B et al.**Antifungal activity of caspofungin in experimental infective endocarditis caused by Candida albicans.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 112, n. 5, p. 370-375.May 2017.

CAPÍTULO 5

METODOLOGIAS DE ESTUDOS TOXICOLÓGICOS PRÉ- CLÍNICOS: *IN VITRO* E *IN VIVO*

Tharcia Kiara de Oliveira Cruz
Joelmir Lucena Veiga da Silva
Maria Eduarda Beserra de Oliveira Menezes

1. INTRODUÇÃO

Os testes DL_{50} foram introduzidos pela primeira vez em 1927, afim de testar substâncias destinadas ao uso humano, tais como o digital e a insulina (BOTHAM, 2003).

Os testes de análise tóxica de produtos são elaborados com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas nos sistemas biológicos e examinar a toxicidade relativa das substâncias que são preponderantes na avaliação do ambiente (BAROSA, 2003).

Na perspectiva de desenvolvimento de novo produto, que possa ser oferecido à sociedade de forma segura e confiável, foram adotadas metodologias usando o microcrustáceo (*Artemia salina*), células em cultura e pequenos roedores, como ratos Wistar para toxicidade aguda e crônica. Esses ensaios são válidos, pois os efeitos produzidos por um composto nos animais de laboratório são aplicáveis ao homem. Com base na dose por unidade de superfície corporal, os efeitos tóxicos no homem estão consideravelmente nos mesmos limites que os observados nos animais de laboratório, sendo possível descobrir prováveis riscos nos humanos (KLASSEN et al., 2001; NOLDIN et al., 2003; AMARAL et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2015).

As intoxicações ocorrem quase sempre em razão de quantidades ou de concentrações excessivas de determinadas substâncias no organismo,

sendo que o mesmo não tenha capacidade de detoxificação necessária. A toxicidade aguda provoca uma resposta rápida num curto período de tempo (por convenção de poucas horas ou poucos dias) para essa análise adota-se como roteiro o protocolo da Portaria SVS N°116 (RUÍZ, 2005).

Com a visão de estudar e proporcionar a comunidade científica métodos de análise de toxicidade definido quanto aos seus efeitos colaterais, este capítulo tem como objetivo demonstrar alguns estudos para detecção de possíveis efeitos tóxicos. Dividida em duas das principais análises que serão explanadas: ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2. ESTUDOS DE TOXICIDADE *IN VITRO*

2.1. TESTE DE TOXICIDADE COM *ARTEMIA SALINA* LEACH

Para realizar toxicidade de produtos naturais, muitos ensaios podem ser utilizados, como o ensaio de letalidade com o microcrustáceo (*Artemia salina*), que foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos vegetais, mas que também pode ser utilizado para expressar a toxicidade de um extrato com atividade moluscicida contra organismos não-alvos, como peixes e pequenos crustáceos (AMARAL et al., 2007).

A *Artemia salina* (Figura 12) é um microcrustáceo de água salgada que serve de alimento para peixe, porém seus ovos são facilmente encontrados em lojas de produtos para aquário. Por ser tão facilmente encontrado e por sua praticidade e resultados rápidos, esse bioensaio é largamente utilizado no meio científico (NASCIMENTO et al., 2008).

Os testes de toxicidade animal, como o bioensaio com *Artemia salina*, são válidos, pois os efeitos produzidos por um composto nos animais de laboratório são aplicáveis ao homem. Com base na dose por unidade de superfície corporal, os efeitos tóxicos no homem estão consideravelmente nos mesmos limites que os observados nos animais de laboratório, sendo possível descobrir possíveis riscos nos humanos (AMARAL et al., 2007).



Figura 12 - Foto de uma *Artemia salina* L.
Fonte: RUIZ et al., 2005.

Materiais: Tubos, aquário, lupas, micropipetas, conta-gotas, abajur, bomba de aquário

Procedimentos: Preparo da Água marinha sintética: Dissolva NaCl: 26,3 g; KCl: 0,75 g; CaCl₂·2H₂O 1,47 g; MgCl₂·6H₂O: 5,10g; NaHCO₃: 0,21 g; MgSO₄·7H₂O: 6,20 g, com pH 8,0 em 1L de água destilada mexendo até homogeneizar.

- Eclosão dos cistos de *Artemia Salinas*: em um recipiente com aproximadamente 500mL de solução mãe adicione cerca de 0,1g e deixe com a agitação de uma bomba submersa por 24 a 48h para a eclosão sob luz.

- Preparo da amostra: **Solução Mãe (S1):** Pesa 1g da amostra; Completa p/ 100ml com o veículo apropriado. Concentração obtida = 10.000 µg/ml. **Solução de trabalho (S2):** Retira 10ml da solução mãe (S1); Completa com 10ml de veículo. Concentração obtida = 1000µg/ml. Posteriormente são realizadas as diluições em cada tubo (Tabela 1).

Tabela 2 - Diluição das amostras.

Amostra (mg)	Água salina (mL)	Larvas
1000 (vol 10ml)	-	10
750	2,5	10
500	5	10
250	7,5	10
125	8,75	10
65	9,35	10

Obs: O branco (Água destilada + larvas), todas as diluições terão que ser feitas em triplicata.

Procedimento: Uma quantidade de 0,3 g de cistos de *A. salina* deve ser mantida em água marinha sintética e incubada por 24-36 h sob iluminação artificial e temperatura de 22°C. Após a eclosão, 10 náuplios devem ser coletados e tratados em tubos de ensaio contendo a solução do extrato a ser testado (entre 50 e 1000 µg mL⁻¹ e um controle). As culturas de *A. salina* também devem ser incubadas a uma temperatura média de 22°C, sendo realizada a leitura do número de sobreviventes e mortos após 24 horas para a determinação da dose letal média (DL50). São consideradas larvas mortas todas que não apresentavam qualquer movimento ativo em cerca de vinte segundos de observação. O ensaio deve ser realizado em triplicata.

2.2. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT

O teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um teste usado para avaliar viabilidade celular. O MTT, quando incubado em células vivas, tem seu substrato solúvel amarelo (tetrazolium) quebrado por enzimas mitocondriais (succinato desidrogenase), transformando-se de um composto um composto azul escuro insolúvel, o formazan (Figura 13). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (MOSMANN, 1983).

É um ensaio colorimétrico, relativamente, simples e rápido, que produz dados quantitativos (ALLEY et al., 1988). O fato dele ser realizado

em placas de 96-poços, um grande número de experimentos pode ser elaborado e com diferentes amostras teste (COLE, 1986), o que é vantajoso para triagem toxicológica para uma célula específica ou até mesmo testar substâncias com potencial efeito anticâncer.

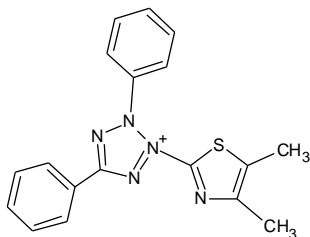


Figura 13 - Reação que ocorre com o MTT na presença de células viáveis.
Fonte: Ward, 2002.

Materiais: solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolína) 5 mg/mL, preparada com o meio de cultura a ser utilizado; dimetilsulfóxido (DMSO); microplaca de ELISA com 96 poços (Figura 14); meio de cultura celular; tampão salina-fosfato (PBS, pH 7,2); estufa a 37° C com atmosfera de CO₂ (5%); câmara de fluxolaminar; espectrofotômetro para leitura de microplaca.

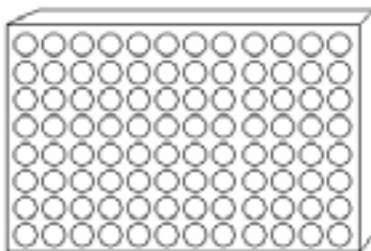


Figura 14 - Ilustração de placa de 96 poços para o experimento.
Fonte: Ward, 2002.

Amostra biológica: células em cultura, isolada de órgãos ou adquirida em banco celular.

Procedimento: preparar a placa com 500 células/poço contendo 200

μL de meio de cultura e a substância/produto teste, por 48 h em estufa. Após este período, incubar 110 μL de MTT (5 mg/mL) por 4h, na estufa novamente. Aspirar o meio e lavar cada poço com PBS, substituir por 200 μL de DMSO, agitar por 30 minutos, e, depois, realizar a leitura da absorvância (abs) no espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm para determinar a viabilidade celular. As células viáveis produzem um composto azul escuro (formazan), enquanto que as mortas não produzem esta coloração. A solução de DMSO foi utilizada para zerar o equipamento. A porcentagem da viabilidade celular é calculada usando a seguinte fórmula: % = [100 x (abs amostra)/(abs controle)].

Finalização dos casos: descarte em lixo biológico das amostras celulares utilizadas.

2.3. ANÁLISE DE CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

O ciclo celular é constituído por uma sequência ordenada de fases. A célula diferenciada se encontra em G₀, onde ela atingiu sua diferenciação terminal e está quiescente (Figura 15). Se a célula está programada a proliferar, ela entra em G₁, período em que aumenta de tamanho e prepara as proteínas de que necessita para a síntese de DNA. Durante esta fase, a célula é sensível às condições ambientais, e alguma exposição pode interromper esta fase. Se elas não forem favoráveis, a divisão celular pára em G₁, e não há proliferação. No entanto, se ultrapassar o ponto R (ponto de restrição), a divisão celular ocorrerá independente de condições ambientais. Na fase S sintetiza-se o DNA que será replicado durante a fase G₂.

No início de G₂ existe outro ponto de controle importante, onde se verificará a qualidade do DNA replicado. Finalmente, na fase mitótica (M), o DNA duplicado será similarmente dividido entre as duas células filhas. A mitose será impedida se, na checagem da mitose, forem verificadas anormalidades na divisão dos cromossomas (WARD, 2002). Sendo assim, substâncias com potencial efeito tóxico podem interromper alguma fase deste ciclo e bloquear a proliferação celular normal, o que pode levar a célula a apoptose ou necrose. Desta forma, a triagem de substâncias/

produtos teste sobre o ciclo celular, de alguma célula específica, poderá revelar a sensibilidade desta célula.

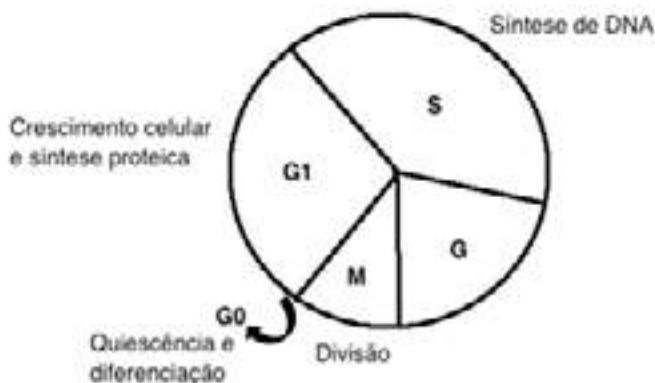


Figura 15 - Esquema do ciclo celular e suas fases.
Fonte: Ward (2002).

Materiais: paraformaldeído (2 %); saponina (0,01%); tampão salina-fosfato (PBS); RNase; iodeto de prodídeo (PI); glicina; câmara de fluxo laminar; citômetro de fluxo.

Procedimento: preparar de 10^{-5} - 5×10^{-5} células por tubo de citômetro, incubar a amostra desejada e o tempo escolhido à temperatura ambiente. Após isto, centrifugar as amostras foram e ressuspendê-las em PBS, fixa-las com paraformaldeído 2 % por 30 minutos, seguidas de permeabilização com saponina 0,01 % por 20 minutos e lavagem com PBS adicionado de glicina (0,1 M). A cada amostra adicionar 10 μ L RNase por 20 minutos, seguido de 5 μ g/mL de PI (na ausência de luz), com o uso de luvas, máscara e descarte de ponteira, por se tratar de uma substância bastante tóxica. Levar as amostras para o citômetro de fluxo, onde as células serão quantificadas e separadas utilizando o canal FL2-H no programa Cell Quest (BD, USA) sob ausência de luz. Os resultados podem ser analisados no programa WinMDI versão 2.9 (BD) e plotados em dotplot ou em histograma. No dotplot as células serão divididas em quatro quadrantes, sendo os miócitos não-viáveis localizados no quadrante inferior esquerdo

e miócitos viáveis no quadrante inferior direito. No histograma é possível observar células na região M1 (fases S e G2/M do ciclo celular), M2 (fases G0/G1 do ciclo celular) e M3 (fase sub-G0/G1, células em apoptose e/ou necrose) (McGAHON et al., 1995).

Finalização dos casos: descarte em lixo biológico das amostras celulares utilizadas.

Importante: Todos os procedimentos devem ser realizados em triplicata.

3. ESTUDOS DE TOXICIDADE *IN VIVO*

Além das análises *in vitro*, vários autores também utilizam estudos agudo de toxicidade em pequenos roedores, com metodologia sugerida pela Resolução - RE nº90 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, no qual determina a publicação do guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos (BRASIL, 2004).

O guia é uma orientação para a condução de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos. Incluem estudos de toxicidade de dose única (toxicidade aguda), toxicidade de doses repetidas (toxicidade crônica), toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética.

Para que se obtenha a segurança e comercialização de produtos que tenham fins fitoterápicos, deve-se antes passar por testes de toxicidades pré - clínicos, para posteriormente o produto ser oferecido à população.

Sinais de toxicidade incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas devem ser anotados. Deve ser observado o maior número possível de parâmetros, tais como alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorréia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso cen-

tral, contorções abdominais, número de animais mortos com possível causa de morte e respectivo exames histopatológicos (BRASIL, 2004).

Rattus norvegicus, da linhagem Wistar (rato branco) são utilizados ao longo dos anos em diversos estudos experimentais, possuem cabeça larga, com cauda mais curta que o seu corpo, orelhas largas e, são resistentes a certas enfermidades respiratórias. A prioridade dada a estes ratos deve-se à facilidade de manuseio e baixo custo (OLIVEITA et al., 2011).

3.1. ENSAIO DA TOXICIDADE AGUDA COM PEQUENOS ROEDORES

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles empregados para analisar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (BRASIL, 2004).

Materiais: O produto teste a ser utilizado deve ser preparado para administração de dose limite a ser testada será de 1000 mg/kg/dia para roedores e não roedores. O Guia relata que em situações, em que essa dose não resulte em uma margem de 10 vezes a exposição clínica deve ser considerada a dose de 2000 mg/kg/dia ou a máxima dose disponível. Utilizar duas vias de administração: (1) a pretendida para administração em humanos e (2) a parenteral. Se a administração endovenosa for a pretendida para uso em humanos, a utilização de apenas esta via para estudos de toxicidade de dose única é suficiente.

Animais utilizados: Devem ser conduzidos com no mínimo duas espécies de mamíferos, comumente os animais escolhidos são ratos e camundongos. Utiliza-se animais adultos (machos e fêmeas), sendo 6 animais por dosagem. Observa-se que os camundongos são mais sensíveis nas análises.

Procedimentos: Após a administração da substância teste observa-se os animais por um período de no mínimo 14 dias. No dia da administração os animais devem ser observados no mínimo duas vezes. Posteriormente, no mínimo uma vez ao dia. Analisar o peso, consumo de ração e água diariamente durante o período do estudo. Após 14 dias os animais são eutanasiados para coleta de material de análise.

Observação: Estes estudos devem ser realizados anteriormente à Fase I da Pesquisa Clínica. Estudos apenas para a determinação de DL50 (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) não são necessários. Podem ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico) (BRASIL, 2004).

Discussão de casos: Oliveira et al. (2015) utilizaram 24 ratos Wistar albinos (*Rattus norvegicus*), machos e fêmeas com idade média de 90 dias e peso variando entre 250 e 300 g. As substâncias administradas nos ratos foram realizadas pelo método de gavagem, onde o grupo experimental recebeu 2000 mg kg⁻¹ do extrato aquoso de amendoim e o grupo controle recebeu o mesmo volume de água destilada. Esses grupos foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos conforme a Tabela 2.

Tabela 3 - Divisão dos animais por grupos

Grupos	Quantidade	Substância
Grupo Experimental Machos	6 animais	produto teste 2000 mg/kg
Grupo Controle Macho	6 animais	Água destilada
Grupo Experimental Fêmea	6 animais	produto teste 2000 mg/kg ⁻¹
Grupo Controle Fêmeas	6 animais	Água destilada

Dados da pesquisa (Oliveira et al., 2015).

Antes de iniciar o experimento os animais ficaram em jejum alimentar por 12hs mantendo apenas água ad libitum onde a mesma foi retirada 1h antes de iniciar os procedimentos. Após as gavagens foi observado parâmetros do Sistema Nervoso Central – SNC e sistema nervoso autônomo (Tabela 3), além de outros parâmetros ligados a ação depressora do corpo

nos animais em 30', 1, 2, 3 e 4hs. Os animais foram pesados no 1º e 14º dia e diariamente medidos o consumo de água e ração. No final do experimento foram coletado sangue para análises hematológicas e bioquímicas, após a eutanásia os principais órgãos (coração, pulmão, fígado, baço e rins) dos animais foram pesados.

Tabela 4 - Protocolo utilizado nas análises dos animais em diferentes tempos.

Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	1 h	2 h	3 h	4 h
HORÁRIO					
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					

Perda do reflexo auricular			
c – Outros comportamentos			
Ambulação			
Bocejo excessivo			
Limpeza			
Levantar			
Escalar			
Vocalizar			
Sacudir a cabeça			
Contorções abdominais			
Abdução das patas do trem posterior			
Pedalar			
Estereotipia			
2 - SN AUTÔNOMO			
Diarréia			
Constipação			
Defecação aumentada			
Respiração forçada			
Lacrimejamento			
Micção			
Salivação			
Cianose			
Tono muscular			
Força para agarrar			
3 – MORTE			

3.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA AGUDA ORAL

Os ensaios de toxicidade pré-clínica aguda em animais de acordo com o “*Guideline for testing of chemicals*” nº 423 da OECD (Organização

para Cooperação e Desenvolvimento Econômico), ocorre da seguinte forma: A substância é administrada por via oral a um grupo de animais experimentais em uma das doses definidas. A substância é testada usando um processo sequencial, com cada etapa empregando três animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas) (OECD, 2001).

Materiais: Doses fixas pré-especificadas de 5, 50, 300 ou 2000 mg / kg são utilizadas. Há uma opção de usar um nível de dose adicional de 5.000 mg / kg, mas somente quando justificado por um precisar.

Animais utilizados: Esta diretriz usa roedores (preferencialmente rato fêmea). Grupos de animais são doseados em um procedimento gradual. Três fêmeas por grupo, sendo submetidos a doses de até 2000 mg/kg(n=3) por via oral. Outros grupos de animais podem ser dosados em doses fixas mais baixas, dependendo da presença de mortalidade, até que o objetivo do estudo seja atingido. Esse modelo adota uma quantidade menor de animais a serem utilizados. Ao grupo controle (n=3) são administrados apenas o veículo. Outros grupos de animais podem ser dosados em doses fixas mais baixas, dependendo da presença de mortalidade, até que o objetivo do estudo seja atingido; isso é, a classificação da substância a testar com base na identificação da (s) dose (s) causadora (s) da mortalidade, exceto quando não há efeitos na dose fixa mais alta.

Discussão de casos: Os animais são observados de perto durante as primeiras 4 horas e diariamente depois disso, durante um total de 14 dias em geral. O peso dos animais deve ser medido a cada semana. Todos os animais devem ser submetidos a uma autópsia geral. Procedimento similar ao Guia Pré Clínicos da ANVISA (BRASIL, 2004).

Estudo realizado por Jonsson et al. (2013), demonstra uma toxicidade oral aguda da moniliformina, foi avaliada em ratos machos Sprague-Dawley de acordo com a Diretriz OECD 423, com uma exposição de dose única. Observações clínicas e alterações histopatológicas foram registradas juntamente com a excreção de moniliformina via urina e fezes, utilizando um novo método de cromatografia líquida - espectrometria de massa. De acordo com o estudo, a moniliformina é altamente tóxica para ratos com uma faixa bastante estreita de toxicidade. A moniliformina pode ser

3.3. ENSAIO DA TOXICIDADE CRÔNICA (DOSES REPETIDAS) COM PEQUENOS ROEDORES

O ensaio com doses repedidas tem como principal objetivo conhecer o perfil toxicológico de produtos usados por um período de tempo indeterminado. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos na fisiologia do animal, hematológicas, bioquímicas, anátomo e histopatológicas (BRASIL, 2004).

Materiais: Administração de drogas e dosagens comumente ao teste agudo, assim, deverá ser utilizada a via em que a droga será administrada em humanos, mas se a absorção em animais for limitada em relação ao homem, também uma via parenteral. As doses utilizadas geralmente são estabelecidas a partir das informações produzidas em estudos de toxicidade aguda ou testes piloto para indicação de doses.

Animais utilizados: Da mesma forma que o estudo agudo, devem ser conduzidos com no mínimo duas espécies de mamíferos, incluindo uma espécie não roedora. Utiliza-se animais adultos (machos e fêmeas), sendo 6 animais por dosagem.

Procedimentos: O período de administração de drogas no experimento deve ser no mínimo o mesmo período de intervenção na pesquisa clínica. Considerando que na pesquisa clínica a droga será utilizada por 2 semanas a duração mínima de administração também será de duas semanas. Os parâmetros a serem avaliados são os mesmos parâmetros mencionados no estudo agudo (Item 3.1). Roedores: Mortalidade, sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água, patologia clínica (hematologia, bioquímica); duração e reversibilidade da toxicidade; investigações anátomo e histopatológicas. Não Roedores: Mortalidade; sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água; patologia clínica (hematologia, bioquímica); oftalmologia; duração e reversibilidade da toxicidade; investigações anátomo e histopatológicas.

Discussão de casos: Rocha et al. (2010), estudaram os efeitos toxicológicos do extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi Ducke* em ratos Wistar durante 90 dias de tratamento. Não foram observados sinais indicativos de toxicidade, e nenhuma morte foi registrada nos grupos controle e tratados (T1=1,22, T2=6,1 e T3=30,5 mg/kg). O consumo de água diminuiu significativamente nos machos, na 9^a, 10^a, 11^a e 12^a semanas e nas fêmeas na 9^a e 10^a semanas, todos tratados com a maior dose (30,5 mg/kg).

Mello e colaboradores (2009), investigou as formulação fitoterápica contendo *Aloe ferox* (aloé), *Quassia amara* (quina), *Cynara scolymus* (alcaçofra), *Gentiana lutea*, (genciana), *Paumus boldus* (boldo), *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada), *Solanum paniculatum* (jurubeba), e *Valeriana officinalis* (valeriana) (Lipotrom®), quanto aos potenciais efeitos tóxicos em doses repetidas. Não foi observado efeitos tóxicos quando administrada por via oral em doses repetidas durante 44 dias às ratas Wistar, incluindo gestação e lactação, em ratos Wistar, e em coelhos Nova Zelândia por 30 dias, em dose 10 vezes maiores que as preconizadas para fins terapêuticos em seres humanos

Considerações finais: A exposição a substâncias químicas pode ocorrer por várias rotas de exposição e por vários períodos de tempo. Como todos os produtos químicos têm o potencial de causar toxicidade em doses suficientemente altas, conjuntos de testes de toxicidade são desenvolvidos para estimar o potencial de risco de substâncias químicas de interesse e para informar decisões de segurança. No entanto, os pesquisadores devem priorizar por testes alternativos seguros minimizado o uso de animais.

REFERÊNCIAS

ALLEY, M.C.; SCUDIERO, D.A.; MONKS, A.; HURSEY, M.L.; CZERWINSKI, M.J.; FINE, D.L.; ABBOTT, B.J.; MAYO, J.G.; SHOEMAKER, R.H.; BOYD, M.R. **Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay.** *Cancer Res*, v. 48, p. 589-601; 1988.

AMARAL, F. M. M.; COUTINHO, D. F.; RIBEIRO, M. N. S. & OLIVEIRA, M. A. **Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Maringá, v. 13, n. 1, p. 27-30, 2007.

BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B. e SOUZA, I. **Teste de toxicidade de cobre para Artemia salina – Poluição e ecotoxicologia marinha**, Nov. 2003.

BOTHAM, P. A. **Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies.** *Toxicology in Vitro*, v. 18, p. 227–230; 2004.

BRASIL. Resolução n.º 90, de 16 de março de 2004. **Determinar a publicação da guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos.** Brasília: ANVISA, 2004.

CHANG, A. S.; SHEEDHARAN, A.; SCHNEIDER, K. R.; **Peanut and peanut products: A food safety perspective.** *Food Control*. n. 32, p. 296 – 303, 2013.

COLE, S.P.C. **Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay.** *Cancer Chemoth Pharm*, v. 17, p 259-263; 1986.

JONSSON, M. J. et al., **Application of OECD Guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin.** *Food and Chemical Toxicology* vol. 53, March, p.27-32; 2013.

KLASSEN, C.O; WATKINS, J. B. **Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos de casarett e doull's.** 5. ed. Editora McGraw-Hill de Portugal, Ltda: Portugal, 2001.

MaGAHON, A.J.; MARTINS, S.J.; BISSONNETTE, R.P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R.J.; NISHIOKA, W.K.; GREEN, D.R. **The end of the (Cell) line: methods for study of apoptosis in vitro.** *Methods on Cell Biology*. New York: Academic Press, 1995. p. 153-185.

MEYER B. N, FERRIGNI N. R, PUTNAM J. E, JACOBSEN L. B, NICHOLS D.E, MCLAUGHLIN J. L. **Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents.** *Plantas Medicinai*, vol. 45: p. 31-34, 1982.

MOSMANN T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J Immunol Methods*, v. 65, p. 55–63; 1983.

NASCIMENTO, J. E; MELO, A. F. M; LIMA E SILVA, T. C; VERAS, J; SANTOS, E. M; ALBUQUERQUE, U, P; AMORIM, E. L. C. **Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de artemia salina leach. de três espécies medicinais do gênero phyllanthus (phyllanthaceae).** *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* São Paulo, v. 29, n. 2, p. 143-148, 2008.

NOLDIN, V. F; CECHINEL F. V; MONACHE, F. D. et al; **Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynarascolymus L.* (artichoke) cultivated in Brazil.** Química Nova. São Paulo, v. 26, n. 3, p. 331-334; 2003.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic

OLIVEIRA, T. K. B; ALMEIDA, F. A. C; ALMEIDA, I. B; OLIVEIRA, M. A. **Estudo toxicológico do extrato aquoso (leite) do amendoim frente á *Artemia salina* Leach e análise agudo em ratos Wistar.** TERRA. Saúde Ambiental e Soberania Alimentar / Giovanni Seabra (Organizador). Ituiutaba: Barlavento. Vol. III. 1525p. 2015.

ROCHA, A.O.B.; PITA, J.C.L.R.; OLIVEIRA, K.M.; MOTA, C.A.X.; ESTEVAM, E.C.; VIANA, W.P.; SILVEIRA E SÁ; R.C.; MELO DINIZ, M.F.F.**Efeito toxicológico do extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi* Ducke em ratos Wistar.** Rev. Bras. Farm. vol. 93, n.3, p. 371-378, 2012.

RUIZ, A. L. T. G., MAGALHAES, E. G., MAGALHAES, A. F., FARIAS, A. D., AMARAL, M. C. E., SERRANO, D. R., MAGALHAES, L. A.**Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae).**Rev Brasileira de Farmacognosia. São Paulo, abr./jun., p. 98-102, 2005.

WARD, L.S. **Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese.** Arq Bras Endocrinol Metab, v. 46, n. 4, p. 351-360; 2002.

A utilização de animais em ensino e pesquisas científicas tem trazido inúmeras discussões acendidas em todo o mundo, mas, sobretudo, acordamos que as pesquisas tornaram-se um caminho para se avançar no conhecimento sobre a ciência em saúde.

Não pretendemos esgotar as metodologias usadas nas pesquisas experimentais; entretanto, esta obra transcorre sobre alguns modelos usados com animais de laboratório. São metodologias que proporcionará ao leitor (acadêmicos, professores e pesquisadores) um guia de procedimentos e metodologias para seus experimentos.

O avanço nos estudos biológico, muitas vezes, requer a utilização dos mesmos, porém tais procedimentos deve ser rigorosamente analisado para que se tenha relevância a saúde humana ou animal de forma ética. A pesquisa com animais torna-se parte integrante e imprescindível no desenvolvimento da ciência, porém, métodos alternativos devem ser prioritários em todas as pesquisas.