



Contenção de ratos com tecido úmido nos testes de pletismografia diminui o estresse animal e melhora os resultados e o tempo de experimentação.

Gyl Everson de Souza Maciel (1); Felipe Cícero Pereira do Nascimento(2); Priscyla Rocha de Brito Lira (4); Carina Scanoni Maia (5)

¹Doutorando, gyl_everson@hotmail.com, priscyla.lira@gmail.com, pereirafelipe1311@gmail.com;
2,3,4,5Universidade Federal de Pernambuco, carina.scanoni@gmail.com.

Resumo: A utilização de animais de laboratório representa um dos maiores dilemas nos debates bioéticos. O princípio dos 3 Rs, sugere a redução do número de animais utilizados em cada experimento, o refinamento das técnicas objetivando evitar a dor e o sofrimento desnecessários, e a substituição de animais por outros meios de pesquisa se possíveis. O refinamento tecnológico na geração de modelos experimentais tem também levado à redução dos números de animais/grupos experimentais, por reduzir de maneira importante a variabilidade observada em cada experimento. Desta forma, a reflexão sobre a necessidade de um modelo biológico e a relevância do estudo devem ser aspectos fundamentais para a decisão de um pesquisador realizar um projeto utilizando animais. Foram usados dois modelos de condicionamento de ratos para avaliar a pressão sistólica e os batimentos cardíacos além de avaliar o tempo gasto em cada experimento de pletismografia de cauda. Para melhorar o bem estar animal, estes, foram enrolados e vendados em um tecido vermelho escuro úmido, tendo o manguito e o receptor de pulso acoplado à cauda. Posteriormente as adaptações. Para obter uma média da PAS, o procedimento de medida em cada rato foi repetido por cinco vezes e descartados o maior e o menor valor. Os níveis médios da pressão arterial sistólica (PAS) do grupo tratado (GT) apresentaram uma diminuição significativa quando comparado ao grupo controle (GC) pelo método de contenção nos dias 0 e 15 da experimentação ($137,1 \pm 2$ mmHg vs. $133,6 \pm 1$), $P < 0,0001$, na devida ordem (Figura 1). Também houve redução significativa nas médias dos batimentos cardíacos (BC), do grupo tratado quando comparado ao grupo controle pelo método de contenção nos dias 45 e 60 do experimento (395 ± 3 bpm vs. 381 ± 5 bpm), o tempo total gasto em média para cada animal no experimento foi 15 minutos no (GT), em quanto no (GC) ficou na média de 35 minutos. Melhorando o experimento e a qualidade de vida dos animais.

Palavras-chave: pletismografia, bem-estar, pressão.

1- Introdução:

O público geralmente sensibiliza-se por relatos de dor ou imagens perturbadoras e bizarras de animais com os quais as pessoas identificam-se prontamente. O cão ou cavalo ferido ou desnutrido causa uma resposta maior de uma pessoa leiga que um rato, ovelha ou galinha com problema similar. O termo bem-estar refere-se a todos os animais, mesmo na presença das variações na sofisticação dos mecanismos de controle da vida e, conseqüentemente, nas variadas formas em que o bem-estar pode ser pobre.

A natureza da utilização humana de um animal ou de sua interação com ele não tem efeito algum sobre a extensão da capacidade do animal de sofrer ou de ser afetado adversamente de qualquer outra forma (BROOM, 1989). Existe uma tendência ilógica das pessoas apresentarem maior preocupação com animais de estimação que com animais mantidos em altas lotações ou largamente isolados do público. Ao se imaginar um coelho apresentando um



certo grau de ferimento ou doença, deve-se lembrar que seu bem-estar é pobre na mesma medida, seja ele um animal de companhia, de laboratório, de produção ou silvestre.

A utilização de animais de laboratório representa um dos maiores dilemas nos debates bioéticos. O princípio dos 3 Rs de Russel & Burch, et al., sugere a redução do número de animais utilizados em cada experimento, o refinamento das técnicas objetivando evitar a dor e o sofrimento desnecessários, e a substituição de animais por outros meios de pesquisa se possíveis.

O refinamento tecnológico na geração de modelos experimentais tem também levado à redução dos números de animais/grupos experimentais, por reduzir de maneira importante a variabilidade observada em cada experimento. Desta forma, a reflexão sobre a necessidade de um modelo biológico e a relevância do estudo devem ser aspectos fundamentais para a decisão de um pesquisador realizar um projeto utilizando animais. Um dos experimentos que mais estressam os animais e usado para aferir a manutenção da pressão arterial (PA) em níveis adequados é essencial para a homeostase do organismo. Na experimentação animal, o método mais utilizado para monitorização da pressão arterial de forma não invasiva é a pletismografia de cauda (MALKOFF, 2005). Este método consiste em colocar a cauda do animal dentro de um esfignomanômetro conectado a um sensor.

O animal é colocado dentro de um contensor de acrílico e levado ao bioaquecedor de 40 °C, para aquecer a cauda do animal. O animal permanece neste local entre 10 a 20 minutos e em seguida levado ao pletismógrafo contendo um esfignomanômetro que será envolvido na cauda do rato. O animal permanece neste local por cerca de 3 a 5 minutos em estado de vigília para se acostumar com o ambiente evitando que o estresse induzido por ele não interfira na pressão arterial. A temperatura é necessária para promover um aquecimento do animal, levando a uma dilatação da artéria caudal. Após este período, o esfignomanômetro é inflado, promovendo a compressão da artéria caudal do animal e possibilitando a medida de pressão realizada pelo aparelho. São aferidas três mediadas sucessivas para cada animal.

Alguns trabalhos demonstraram uma boa correlação entre as medidas direta e indireta de pressão sanguínea em 9 diferentes modelos de animais. (Ikeda e cols., 1991; Krege e cols., 1995). Mesmo devidamente validada, a metodologia de pletismografia de cauda ainda é passível erros, particularmente quando é utilizada para quantificar modestas alterações da pressão arterial. Para minimizar esses erros, cada laboratório deve sempre validar a sua própria metodologia de pletismografia sob condições experimentais semelhantes às já existentes. Por tanto temos como objetivo avaliar se o novo método de contenção usado



melhora os resultados e encurta o tempo gasto no procedimento e proporcionar estresse reduzido nos animais.

2- Metodologia

2.1- Animais

Ratos machos Wistar aos 90 dias de vida foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, sob o ciclo de claro/escuro 12/12. Divididos em dois grupos: grupo controle (GC, n=5) que recebeu a metodologia convencional e o grupo tratado (GT, n=5) no qual foi usada a nova técnica de contenção. O uso dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da UFPE, Processo: 23076.026362/2014-56.

Os animais foram acompanhados quinzenalmente, dos 90 aos 150 dias de vida, para a avaliação da pressão arterial sistólica (PAS). Aos 150 dias de vida os animais foram sacrificados, por guilhotina, para coleta de sangue e tecidos (rins, fígado, coração e aorta).

2.2- Avaliação da pressão arterial sistólica

Os ratos com idades de 90, 105, 120, 135 e 150 dias, foram acondicionados por três dias consecutivos em um tubo cilíndrico de acrílico, no qual a cauda era aquecida e o animal ventilado de maneira adequada a realização das medidas de pressão arterial sistólica. Para tal procedimento, a cauda dos animais era encaixada a um manguito de borracha que foi adaptado à região proximal da cauda e ligado ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 50 segundos. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso (sensor) que captava os sinais a serem enviados e registrados em computador.

O experimento só teve início após um período de adaptação dos animais e da estabilização dos sinais de pulso e frequência cardíaca (FC). No registro da pressão sanguínea por pletismografia de cauda ocorre a perda e o retorno dos sinais pulso e FC durante o processo de insuflação e de desinsuflação do manguito, diante disso a pressão arterial sistólica (PAS) era considerada como sendo o primeiro sinal de pulso de retorno deste processo. Já para análise da FC foram selecionados intervalos de dez segundos entre os ciclo de insuflar e desinsuflar. A PAS e a FC foram consideradas como a média de no mínimo cinco medidas.



O sinal era captado e conectado a um amplificador de sinais, RTBP 2000 Rat Tail Blood Pressure System For Rats and Mice (Kent Scientific Corporation) e conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália). A comunicação de dados entre o PowerLab e o computador se dá através de um cabo conectado a uma placa SCSI onde o software *Chart for Windows*® gerava os registros de pulso, pressão da bomba e frequência cardíaca a partir dos dados enviados pelo amplificador de sinais e conversor analógico digital.

2.3- Avaliação da pressão arterial sistólica com redução do estresse

Os ratos com idades de 90, 105, 120, 135 e 150 dias, foram acondicionados por três dias consecutivos em um tecido úmido e escuro, no qual a cauda era aquecida e o animal ventilado de maneira adequada a realização das medidas de pressão arterial sistólica. Para tal procedimento, a cauda dos animais era encaixada a um manguito de borracha que foi adaptado à região proximal da cauda e ligado ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 50 segundos. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso (sensor) que captava os sinais a serem enviados e registrados em computador.

O experimento só teve início após um período de adaptação dos animais e da estabilização dos sinais de pulso e frequência cardíaca (FC). No registro da pressão sanguínea por pletismografia de cauda ocorre a perda e o retorno dos sinais pulso e FC durante o processo de insulflação e de desinsulflação do manguito, diante disso a pressão arterial sistólica (PAS) era considerada como sendo o primeiro sinal de pulso de retorno deste processo. Já para análise da FC foram selecionados intervalos de dez segundos entre os ciclo de insuflar e desinsuflar. A PAS e a FC foram consideradas como a média de no mínimo cinco medidas.

O sinal era captado e conectado a um amplificador de sinais, RTBP 2000 Rat Tail Blood Pressure System For Rats and Mice (Kent Scientific Corporation) e conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália). A comunicação de dados entre o PowerLab e o computador se dá através de um cabo conectado a uma placa SCSI onde o software *Chart for Windows*® gerava os registros de pulso, pressão da bomba e frequência cardíaca a partir dos dados enviados pelo amplificador de sinais e conversor analógico digital.

A pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) foram medidas por pletismografia de cauda (IITC Life Science B60-7 / 16", Life Science Instruments, Woodland Hills, CA) em ratos conscientes com idades de 90, 105, 120, 135 e 150 dias. Os animais foram aclimatados às condições experimentais para a obtenção da PAS durante três dias



consecutivos. Para analisar se a metodologia de pletismografia de cauda poderia influenciar na pressão arterial sistólica (PAS) e na frequência cardíaca (FC), realizamos mensuração da PAS e da FC por medição indireta não simultaneamente nos grupos de animais em estudo.

Para tal, foram realizadas medidas indiretas da pressão arterial sistólica por pletismografia de cauda em parte dos animais, nos quais foram enrolados e vendados em um tecido vermelho escuro úmido, tendo o manguito e o receptor de pulso acoplado à cauda. Posteriormente as adaptações. Para obter uma média da PAS, o procedimento de medida em cada rato foi repetido por cinco vezes e descartados o maior e o menor valor.

2.4- Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t*, não pareado. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $P < 0,05$.

3- Resultados e Discussão

A metodologia de pletismografia de cauda utilizada em nosso estudo foi empregada no intuito de avaliar níveis de pressão arterial sistólica, por ser uma técnica não invasiva, fácil manuseio e baixo custo. Além disso, trabalhos na literatura demonstraram uma excelente correlação entre as medidas indiretas de pressão sanguínea adquirida por pletismografia de cauda com as medidas diretas (Wen e cols., 1988; Krege e cols., 1995; Ibrahim e cols., 2006). Nossos achados revelaram também que a contenção dos animais em um tecido úmido, além de vedados reduz o estresse causado pelo experimento de pletismografia.

Os níveis médios da pressão arterial sistólica (PAS) do grupo tratado (GT) apresentaram uma diminuição significativa quando comparado ao grupo controle (GC) pelo método de contenção nos dias 0 e 15 da experimentação ($137,1 \pm 2$ mmHg vs. $133,6 \pm 1$), $P < 0,0001$, na devida ordem (Figura 1). Também houve redução significativa nas médias dos batimentos cardíacos (BC), do grupo tratado quando comparado ao grupo controle pelo método de contenção nos dias 45 e 60 do experimento (395 ± 3 bpm vs. 381 ± 5 bpm), (Figura 2). Tais alterações podem estar relacionadas com o bem-estar precário desses animais que podem ser evidenciados por mensurações fisiológicas, por exemplo, aumento de frequência cardíaca.

Uma variedade de técnicas tem sido oferecida por diferentes pesquisadores com o objetivo de minimizar o estresse animal e melhorar a confiabilidade de aferição, incluindo tamanho adequado do contensor, temperatura de aquecimento corporal, condicionamento animal, utilização de um único técnico para realização das aferições, equipamentos livres de odores e

limitação do campo visual animal, onde são cobertos por uma toalha vermelha para redução de seu campo visual (BUNAG, 1983; MENETON et al., 2000), a cor vermelha não é identificada pelo animal.

A temperatura corporal é outro fator importante para medidas consistentes de pressão arterial. A termorregulação é o método pelo qual o animal diminui a sua temperatura corporal dissipando o calor através do aumento do fluxo sanguíneo caudal. A temperatura de aferição da pressão arterial de forma indireta varia de acordo com o protocolo utilizado, mas deve permanecer entre 30°C e 35°C para não causar um superaquecimento do animal, gerando assim aumento do nível respiratório e maior estresse (MENETON et al., 2000; WHITESALL et al, 2004). Nossos resultados mostram que o tempo total gasto em média para cada animal no experimento foi 15 minutos no (GT), em quanto no (GC) ficou na média de 35 minutos, o que pode esta relacionada com a temperatura corporal, já que a contenção experimental evita o hiperaquecimento do animal.

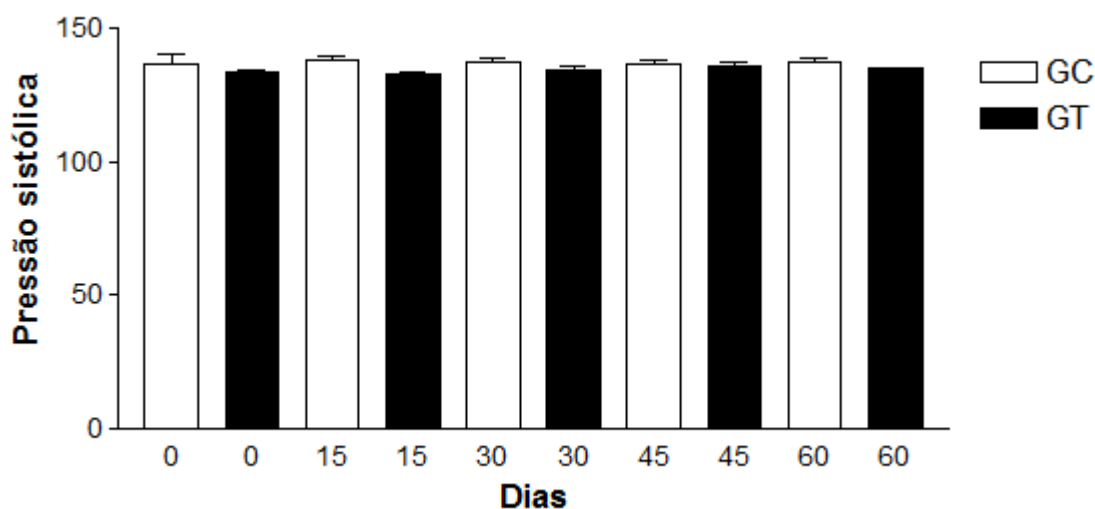


Figura 1. Os níveis médios de pressão arterial sistólica (PAS) do grupo tratado (GT) apresentaram uma diminuição significativa quando comparado ao grupo controle (GC) pelo novo método de contenção ($137,1 \pm 2$ mmHg vs. $133,6 \pm 1$, $P < 0,0001$)

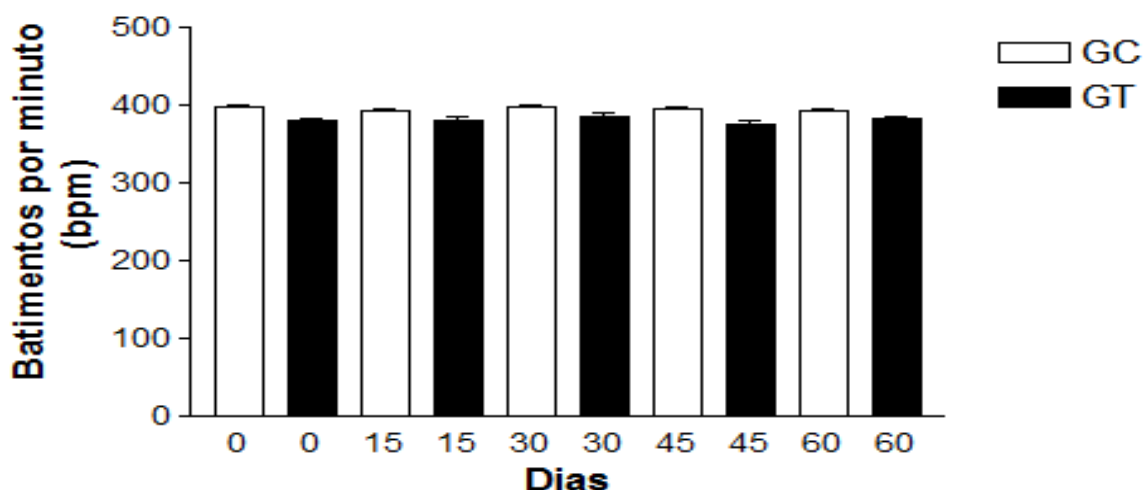


Figura 2. Os níveis médios dos batimentos cardíacos por minuto (bpm) do grupo tratado (GT) apresentaram uma diminuição significativa quando comparado ao grupo controle (GC) pelo novo método de contenção (395 ± 3 bpm vs. 381 ± 5 bpm, $P < 0,0001$)

4- Conclusões

Nossos resultados mostram que o cuidado com o bem estar animal, junto com o uso de toalha úmida e vermelha no condicionamento, melhora tanto os resultados de pressão arterial sistólica como reduz os batimentos cardíacos por minuto além de diminuir o tempo gasto na experimentação de pletismografia de cauda em ratos.

5- Referencias

BLAND, J.M; ALTMAN, D.G. Statistical methods for assessing the agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, London, v.1, n. 8476, p. 307-310, 1986.

BROOM, D.M., Ethical dilemmas in animal usage. In: PATERSON, D.; PALMER, M. *The Status of Animals*. Wallingford: CAB International, 1989. p.80-86.

BUNAG, R.D., Facts and fallacies about measuring blood pressure in rats. *Clinical and Experimental Hypertension. Part A, Theory and Practice*, Marcel Dekker, v. 5, n. 10, p. 1659-1681, 1983.

IBRAHIM, J., BERK B.C. & HUGHES A.D. Comparison of simultaneous measurements of blood pressure by tail-cuff and carotid arterial methods in conscious spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clin.Exp.Hypertens*. 28, 57-72. 2006.

KREGE J.H., HODGIN J.B., HAGAMAN J.R. & SMITHIES O. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension*. 25, 1111-1115. 1995.



MACHADO, H.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M. Implantação e Padronização da Técnica de Aferição Indireta da Pressão Arterial em Ratos Wistar da Colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR). *Rev. Inter. Est. Exp.*, v. 2, n. 2, p60-61, 2010.

MALKOFF, J. Non-Invasive Blood Pressure for Mice and Rats. *Animal Lab News*, 2005. <http://www.alnmag.com/article>. Acessado em 03/2010.

MENETON, P.; ICHIKAWA, I.; INAGAMI, T.; SCHNERMANN, J. Renal physiology of the mouse. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, Bethesda, v. 278, n. 3, p. F339-F351, 2000.

MALKOFF, J. Non-Invasive Blood Pressure for Mice and Rats. *Animal Lab News*, 2005. <http://www.alnmag.com/article>. Acessado em 04/2017.

RUSSELL, W.M.S., BURCH, K.L. The principles of humane experimental technique. UFAW, London: UFAW; 1992. [cited 2008 jan]. Available from: <http://altweb.jhsph.edu/>.

WEN, S.F., TREMBLAY J.M., QU M.H.& WEBSTER J.G. An impedance method for blood pressure measurement in awake rats without preheating. *Hypertension* 11, 371-375. 1988.

WHITESALL, S.E.; HOFF, J.B.; VOLLMER, A.P.; D'ALECY, L.G. Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radio telemetry and tail-cuff methods. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Monthly, v. 286, n. 6, p. H2408-H2415, 2004.