

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ANIMAIS DE LABORATÓRIO

HASSIB ASHCAR

Assistente do Diretor do Instituto Adolfo Lutz.

- I. *Importância do Biotério*
- II. *Animais de laboratório mais usados e principais aplicações.*
- III. *Conceito de animal de experiência.*
- IV. *Condições somáticas e imunológicas: sua importância.*

I. IMPORTÂNCIA DO BIOTÉRIO

Em todas as ciências biológicas, e particularmente na medicina, a observação e a experimentação constituem os métodos do estudo científico para a invenção e a descoberta. Essas últimas só poderão ser favorecidas, quando providas as modernas necessidades das pesquisas científicas e da proteção dos pesquisadores. Dessas necessidades, uma das mais importantes nos laboratórios científicos de fisiopatologia, bacteriologia e farmacodinâmica, é o biotério.

As limitadas possibilidades de experimentação em seres humanos obrigam, necessariamente, os pesquisadores a recorrer aos chamados animais de laboratório. Desses, os que por suas dimensões são considerados de grande porte destinam-se, principalmente, aos serviços de produção, enquanto que os de pequeno porte são mais propícios às pesquisas.

O biotério, que deve prover e manter os animais em condições ótimas para as provas "in anima vili", merece, atualmente, atenção especial, em virtude do grande desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas e da aplicação de novos e mais rigorosos métodos de pesquisa.

Já é passado o tempo em que o biotério tinha como função, apenas, alojar e alimentar, empiricamente, os animais para as ex-

periências "in vivo". Nesse sentido, nada nos pareceu mais expressivo do que a frase de Courmont: "A l'heure actuelle, les recherches scientifiques sont trop complexes pour se contenter de la cave de Claude Bernard ou du grenier de Pasteur".

II. ANIMAIS DE LABORATÓRIO MAIS USADOS E PRINCIPAIS APLICAÇÕES

A) MAMÍFEROS

a) *Símios*: Esses animais prestam-se principalmente ao estudo experimental das moléstias humanas produzidas por virus filtráveis. Vejamos as espécies mais sensíveis, citadas por Levaditi e Lèpine, a algumas dessas moléstias.

Tifo exantemático: *Troglodytes niger* (chimpanzé), *Macacus sinicus*, *M. cynomolgus*, *M. inuus*, *Ateles vellerosus* e *M. rhesus*.

Febre amarela: *Macacus rhesus*, *M. cynomolgus*, *M. speciosus* e *M. inuus*.

Moléstia de Nicolas-Favre: *M. cynomolgus*, *Troglodytes niger*, *Cercopithecus callithrix*, *M. inuus*, *Cercocebus fulliginosus*, *Cynocephalus babuin*, *Cebus fatuellus*, etc.

Herpes: *M. cynomolgus*, *C. callithrix*, *C. fulliginosus*, *M. sinicus*, *Papio sphynx*, *Cynocephalus hamadryas*, *C. babuin* e *Cebus olivaceus* (América do Sul).

Encefalite letárgica: *Cercopithecus pathas*.

Poliomielite anterior aguda: *M. rhesus*, *M. cynomolgus*, *C. callithrix*.

b) *Perissodáctilos*: O cavalo (*Equus caballus*) é usado, principalmente, no preparo de séros terapêuticos: antimicrobianos, antitóxicos e antipeçonhentos. Dele ainda se obtém o soro normal para meios de cultura.

c) *Artiodáctilos*: O boi (*Bos taurus*) presta-se aos mesmos fins que o cavalo, porém é empregado em menor escala.

O carneiro (*Ovis aries*) é doador de sangue, cujos glóbulos vermelhos são indicadores de hemólise em reações de fixação do complemento e fornecedor de sangue para meios de cultura.

A cabra (*Capra hircus*), de pele branca, é usada na standardização de toxina estreptocócica.

d) *Carnívoros*: O cão comum (*Canis familiaris*) é muito utilizado nos trabalhos de cirurgia experimental e nos de fisiologia (dosagem de hormônios de cortex supra-renal e das glândulas paratireóides). Imunizado com o vírus da raiva, fornece o material para o preparo da vacina anti-rábica de uso veterinário.

O gato doméstico (*Felis catus*) é sensível aos vírus da: febre amarela, raiva, varíola e tracoma. Apresenta grande interesse nos ensaios de farmacodinâmica e no estudo da amebiose (sensível experimentalmente a *Entamoeba histolytica*).

e) *Roedores*: Coelho, cobaias, ratos e camundongos, animais sensíveis, de fácil aquisição e manipulação, são os eleitos para a maior parte das pesquisas.

Entre outras aplicações, citamos as provas de: proteção de soros terapêuticos; toxigenicidade de exotoxinas; virulência de microorganismos e de conservação da atividade patogênica de vírus filtráveis (inoculações sucessivas). Vejamos, particularmente, a cada espécie, os serviços em que são utilizados.

1) *Leporídios* — Coelho doméstico (*Lepus cuniculus*) — preparo de vacina anti-rábica de uso humano; preparo de soro hemolítico para as reações de Bordet e Gengou, de soros aglutinantes específicos para diagnóstico bacteriológico e de soro precipitante para identificação de proteínas; obtenção de antitoxinas, bacteriolisinas, citoxinas, etc.. Reação de Fridmann (coelhas com, pelo menos, 17 semanas de idade e 1500 grs. de peso).

2) *Cavídios* — A cobáia doméstica (*Cavia porcellus*) — e a preá comum (*Cavia aperea*) e outras, *C. rufescens* e *C. cutleri* constituem as espécies mais utilizadas. Empregam-se cobaias para: isolamento, identificação e prova de virulência de microorganismos; dosagem de toxinas e de antitoxinas; determinação do poder antigênico de anatoxinas; provas de inocuidade de medicamentos; obtenção de alexina para as reações de fixação do complemento; dosagem do hormônio do lobo posterior da hipófise; córneo-reação para determinação do limite da atividade do vírus vacínico (método de Gins); isolamento e passagens de vírus filtráveis; provas de proteção e de imunidade cruzada no estudo das relações imunológicas entre as várias Rickettsioses.

3) *Murídios* — Na tribu *murinae*, distinguimos com Trouesart (1881) e Miller (1910) citados por Donaldson, os gêneros:

Epyymis para as espécies maiores — os ratos; e, *Mus* para os representantes menores — os camundongos. Do gênero *Epyymis*, o rato branco é uma espécie docil que, reagindo facilmente às dietas de carência, é consagrada ao estudo experimental das vitaminas. Utilizam-se também os ratos para: dosagens biológicas de hormônios; transplantação de tumores e estudo de compostos químicos carcinógenos; verificação de espiroquetas e cogumelos patogênicos; transmissão experimental do bacilo de Stefansky; pesquisas fisiológicas (método de parabiose), etc..

Do gênero *Mus*, interessam, particularmente, os camundongos brancos, os quais são usados para: provas de virulência de pneumococos e estreptococos (16 a 20 gramas); provas de inocuidade de medicamentos, isolamento, identificação e determinação da toxigenicidade de microorganismos (20 a 30 gramas); prova de Aschheim-Zondek (camundongas jovens de 6 a 8 gramas); isolamento e passagem de virus filtráveis patogênicos.

B) AVES

Na estandardização biológica do hormônio testicular, emprega-se o "test" da crista de galo, introduzido na fisiologia experimental por Peyard. Para essa prova, servem tanto a crista como os brinco de galo castrado de raça Leghorn.

Os embriões de galinha, inoculados, na membrana cório-alantóidica, com virus vacínico puro, produzem a polpa para a vacina Jeneriana. Por semelhante técnica, obtem-se cultura de Rickettsias.

A pomba (*Columba livia domestica*), columbino muito sensível aos venenos ofídicos, é habitualmente usada para as dosagens dos mesmos.

Os canários, entre os passaros, são usados pelos ingleses para verificação da presença de concentrações tóxicas de CO nas minas de carvão; entretanto, segundo Desfosses, os alemães dão preferência aos camundongos, em substituição aos detentores químicos.

C) ANFÍBIOS

Entre os anuros, citaremos: a rã (*Leptodactylus ocellatus*) e o sapo (*Bufo marinus*).

A rã, espécie inócua, é muito utilizada nos trabalhos de fisiologia experimental e farmacodinâmica. Presta-se ao estudo dos mo-

vimentos cardíacos, respiratórios e intestinais; da ação do vago (inibidor) e do simpático (excitador) sobre o coração; da ação que, sobre esse órgão, exercem a bile, pilocarpina, clorofórmio, eter, nicotina, muscarina, atropina, etc.. Outros exemplos encontram-se descritos por Moura Campos.

III. CONCEITO DE ANIMAL DE EXPERIÊNCIA

Os animais de laboratório embora elevados na escala zoológica, diferem muito do homem, no campo da experimentação.

Nas provas "in anima nobili", ao lado dos fenômenos fisiológicos, interferem as atividades psíquicas e espirituais; ao passo que "in anima villi" tudo se reduz aos fenômenos fisiológicos.

Assim, no conceito de A. Paulino, a moléstia, no homem, é uma desgraça e uma prova individual e familiar; enquanto que, no animal, não passa de uma desordem somática.

Segundo o luminoso princípio de Broussais, a moléstia, para o biologista, constitue uma experiência espontânea, pois, as leis que regem o organismo doente são as mesmas que as do organismo normal, só variando a intensidade dos fenômenos.

O animal de experiência, na maioria das provas, exerce uma função semelhante à de um meio de cultura nas pesquisas bacteriológicas, ou, à de um reagente ou indicador nas determinações químicas. Nessas últimas, o reagente deve ter composição química definida, e, os fatores físicos interferentes deverão ser bem conhecidos, para que as análises possam ser comparadas, tanto qualitativa como quantitativamente.

Por outro lado, o meio artificial de cultura deve conter todos os alimentos, indispensáveis à nutrição e à reprodução dos germes, acompanhados de uma série de fatores físicos e químicos que devem variar segundo as espécies dos microorganismos, tais como: temperatura, grau de humidade, aerobiose ou anaerobiose, concentração hidrogeniônica, etc..

Por sua vez, o animal de experiência deve apresentar determinadas condições somáticas e imunológicas, segundo a prova a que se destina.

Analisaremos, no capítulo seguinte, essas condições, considerando conhecidas a suscetibilidade ou sensibilidade da espécie, raça ou variedade animal.

IV. CONDIÇÕES SOMÁTICAS E IMUNOLÓGICAS: SUA IMPORTÂNCIA

A) CONDIÇÕES SOMÁTICAS

1) *Higidez* — É essencial que os animais para laboratório sejam sadios, fortes, de desenvolvimento normal e livres de infecção ou infestação.

A obtenção de animais em condições de higidez plena depende de uma série de fatores complexos, que passaremos em rápida revista.

O estudo da hereditariedade, cuja base é o mendelismo, constitui os fundamentos da eugenia, da fitogenética, como também da zoogenética. Dos conhecimentos de zoogenética dependem, em grande parte, os resultados zootécnicos.

Cuidados especiais devem-se ter com a criação dos animais, selecionando os reprodutores, evitando a consanguinidade, protegendo a prenhez, observando as condições ótimas de aleitamento, desmame e separação dos sexos.

Influem no crescimento, na saúde e na resistência dos animais: a temperatura, luminosidade, arejamento e humidade; entretanto, fator particularmente decisivo é a alimentação. Os alimentos devem ser rigorosamente adequados sob os aspectos qualitativo e quantitativo, considerando-se, naturalmente, os hábitos alimentares das diferentes espécies. O teor vitamínico dos alimentos deve ser especialmente considerado na ração de camundongos e ratos, pois, sabemos quão sensíveis o são aos regimes ou às dietas de carência.

Para a prevenção das moléstias é necessário que os biotérios possuam instalações adequadas que facilitem a lavagem diária e a desinfecção periódica. Evitam-se prejuízos técnicos e econômicos pela profilaxia rigorosa das epizootias isolando e examinando os animais suspeitos, sacrificando e autopsiando os animais doentes, e incinerando os com moléstia transmissível.

2) *Peso* — Satisfeitas as condições de higidez e suscetibilidade às provas experimentais, o peso do animal é o fator que geralmente tem maior importância. Com efeito, estabelece-se a dose tóxica ou a dose mortal de uma droga, referindo-se ao peso de determinado animal. Do mesmo modo, em método padrão para a determinação de D.M.M. de uma toxina bacteriana é especificado o peso da espécie animal dentro de limites definidos.

Bem sabemos que do peso do animal depende o volume da massa sanguínea e que, variando o volume dessa última, variará no organismo a concentração da droga ou de outra substância administrada. Ainda mais se evidencia a importância do peso porque não é só a massa sanguínea que faz variar a ação de uma droga, mas todos os tecidos em que a mesma tem de agir ou de se fixar.

Os limites de peso a que acima aludimos são permitidos, em vista da impraticabilidade de se obter grande quantidade de animais com uma única determinação numérica ponderal.

Para ilustração do exposto, analisaremos um quadro do "Standard Methods":

Distribuição de cobaias para provas de laboratório

	gramas
Isolamento e identificação de <i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i>	100 a 150
Dosagem das toxinas e antitoxinas diftérica e botulínica, desintoxicação da toxina diftérica (método sub-cutâneo)	230 a 280
Dosagem da toxina diftérica e de diluições da mesma pela prova intradérmica de suscetibilidade (Schick) (método sub-cut.)	250 a 280
Provas de virulência do <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (método intradérmico)	250 a 350 (branca)
Isolamento e identificação de microorganismos	250 a 350
Determinação do poder antigênico dos toxóides diftéricos (líquidos) (método sub-cutâneo)	270 a 320
Verificação dos corpúsculos de Negri (raiva), aproximadamente	300
Dosagem da toxina, antitoxina e toxóide tetânicos (método sub-cutâneo)	330 a 380
Provas de inocuidade de medicamentos para uso humano	350 a 500
Dosagem da toxina e antitoxina diftéricas (método intradérm.)	350 a 450 (branca)
Determinação do poder antigênico do toxóide diftérico precipitado (método sub-cutâneo)	470 a 520
Para complemento, nas reações serodiagnósticas (previamente usadas ou normais), preferivelmente acima de	600

3) *Idade*: — Os animais jovens, de um modo geral, apresentam maior suscetibilidade do que os adultos. Nos primeiros a excitabilidade reflexa é mais exagerada, em virtude do incompleto desenvolvimento dos aparelhos: de inibição, de termoregulação, glandulares, de secreção e de eliminação. Com efeito, Penam e Simonet, Sordelli, Houssay e Massocco verificaram que os animais jovens são mais suscetíveis à insulina do que os adultos.

Lemos Monteiro verificou que os gatos domésticos jovens são mais sensíveis ao vírus amarelado, inoculado por via cerebral; e assim, poderíamos citar uma longa série de exemplos.

Em oposição, fogem à regra acima referida, os resultados das experiências de Lesné e Binet e das de Falk, citadas por R. Pereira. Os primeiros investigaram a suscetibilidade de certos animais em relação à ação tóxica da estricnina e da morfina para gatos e da cocaina para ratos, concluindo que os animais jovens são mais resistentes a esses tóxicos do que os adultos.

O segundo, procurando estabelecer a dose mínima mortal de estricnina para coelhos, cobaias e ratos, verificou que esse alcalóide é mais tolerado pelos animais jovens do que pelos adultos. Em certas experiências, a idade do animal apresenta um interesse maior do que o peso; tal acontece, por exemplo, nas pesquisas de hormônios que agem sobre o aparelho genital.

Concluindo diremos que, em princípio, devem ser excluídos das pesquisas habituais os animais muito velhos, e que o uso de jovens ou adultos depende da espécie animal e da natureza da prova experimental.

4) *Sexo*: — Na maioria das pesquisas é indiferente o emprego de machos ou de fêmeas; entretanto, há casos em que é formal o uso de animais de um determinado sexo (pesquisa de hormônios gonadotrópicos). As fêmeas, nas pesquisas habituais, devem, no entanto, estar livres e desembaraçadas de prenhez. A algumas provas experimentais os animais se comportam de modo diferente conforme o sexo. Exemplo curioso nos oferece a rã: no macho, devido ao reflexo do abraço "clasping reflex" peculiar ao sexo masculino, a estricnina provoca o cruzamento dos membros anteriores sobre o torax, enquanto na fêmea esses membros se distendem ao longo do corpo.

Outro exemplo interessante é o da diferença de sensibilidade da cobáia, ao arsênico, segundo o sexo.

Assim, Preyer, citado por R. Pereira, verificou que para matar-se um cobáio basta a dose de 8 miligramas, enquanto que para uma cobáia seria necessária uma dose de 17 miligramas, chamando ainda a atenção para o fato de que o macho, nesta espécie, é em geral mais volumoso do que a fêmea.

5) *Côr*: — A *côr* do pelo e da pele em si parece não influir nos resultados das pesquisas, pois está na dependência da espécie, raça ou variedade animal.

Quanto à *côr* do pelo, Laigret, observou que a sensibilidade do camondongo branco é igual à do cinzento, em relação ao vírus amarílico. Com relação à pele devem ser preferidos para as intradermo-reações os animais de pele branca, pois nesses torna-se mais nítida e segura a leitura dos resultados.

B) CONDIÇÕES IMUNOLÓGICAS

Depreende-se a importância dessas condições, pela utilização ampla de animais em trabalhos de imunologia.

Nas pesquisas imunológicas, a escolha de cada espécie animal depende, principalmente, da suscetibilidade a determinados antígenos e da constância das reações em resposta aos mesmos.

Na prática, entretanto, os resultados de tais pesquisas apresentam uma variabilidade considerável, mesmo tratando de animais da mesma espécie, idade e peso. Essa variabilidade, para alguns, depende de puras variações individuais, para outros, entretanto, reside nas diferenças morfológicas referentes ao tamanho do corpo, *côr* do pelo, tipo de pele, etc., provenientes de cruzamentos entre as raças da mesma espécie.

Analisaremos, para clareza do assunto, alguns exemplos de influência da raça sobre o comportamento imunológico.

Ubisch e P. do Amaral verificaram nítidas diferenças no comportamento das duas espécies, cobáia e preás, em relação ao antígeno diftérico. A *C. porcellus* reage facilmente à excitação antigênica, enquanto a *C. rufescens* mostra-se mais resistente, apresentando muito menor capacidade de produção de antitoxina diftérica.

Por outro lado, Souto e Ubisch observaram que os preás são mais resistentes ou, por outra, menos suscetíveis à toxina tetânica do que as cobáias. Disso decorre, evidentemente, a possibilidade de, empregando preás, obter títulos acima do real, quando se procura estabelecer a D.M.M. (dose mínima mortal) ou o L† (limite morte) da toxina; ou quando se dosa o poder protetor da antitoxina tetânica.

Digamos de passagem que nos serviços de imunização tem grande importância a escolha da via de inoculação, sendo preferíveis as vias de absorção mais lenta.

Outro fato que deve ser considerado é o da existência de imunidade anterior natural ou adquirida, nos animais de experiência; nesse sentido, não podemos deixar de referir as pesquisas de Ramon e seus colaboradores. Assim, esses AA., pesquisando a antitoxina estafilocócica no soro sanguíneo de 55 macacos (cinocefalos), verificaram a existência da mesma em todos eles.

Pesquisando a imunidade natural de 35 coelhos adultos do Instituto Butantã, que pertenciam às raças: russo, chinchila, azul de Viena e híbrida, verificamos que em 14 deles, o título de antitoxina estafilocócica do soro sanguíneo variava de 0,1 a 3,0 U.A.I. por cc.. Nos outros 11 coelhos os títulos permaneceram abaixo de 0,1 U.A.I., nos parecendo que esses animais não possuíam qualquer traço de antitoxina estafilocócica naturalmente adquirida.

Assim como verificara Ramon, pudemos observar que o referido título não depende da raça do animal.

Grasset, estudando experimentalmente a relação entre a imunidade antitóxica passiva e ativa no ciclo vital do coelho, verificou que: a imunidade passiva (de origem materna) vai decrescendo em valor, a partir do nascimento, tendendo a tornar-se nula entre o 2º e o 3º mês de vida. Por outro lado, a imunidade ativa, iniciando-se aos primeiros dias de vida se elevava progressivamente até atingir um nível apreciável após o 4º mês.

Depois das descobertas de Mendel que edificaram uma teoria biológica à semelhança das teorias físicas e químicas, que permite previsões que a observação e a experiência confirmam, perguntamos: a variação chamada individual, dos títulos antitóxicos de soros obtidos de animais da mesma espécie, idade e peso e imunizados em condições idênticas, não estaria ligada a fatores cromosômicos?

Nossa impressão é que seria útil e interessante analisar, minuciosamente, as condições imunológicas, para cada espécie animal que interessa, em relação ao plasma germinativo e ao fenótipo, na tentativa de tornar sondáveis, pelo menos, alguns dos atuais "mistérios" da Imunologia.

RESUMO

No presente trabalho, o A. faz considerações sobre a importância do biotério nos laboratórios científicos; menciona uma série de espécies animais e os principais serviços técnicos em que elas

são utilizadas. Discute o conceito de animal de experiência, e, finalmente, analisa a importância das condições somáticas e imunológicas nas provas "in anima vili".

ABSTRACT

In the present paper the A. considers the importance of the animal house in the scientific laboratories; he mentions a series of animal species and the principal technical works in which they are used. He also discusses the meaning of laboratory animal, and, finally, analyses the importance of the somatic and immunologic conditions in the tests made "in anima vili".

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit stellt der Autor Betrachtungen ueber die Wichtigkeit eines Tierparkes fuer das wissenschaftliche Laboratorium auf. Er erwaehnt eine Reihe von Tierarten und die hauptsaechlichsten technischen Arbeiten, in welchen dieselben verwendet werden. Er bespricht den Begriff des Versuchstieres und -analysiert die Wichtigkeit der immunologischen und somatischen Bedingungen bei den Experimenten "in anima vili".

BIBLIOGRAFIA

- ASCHHEIM, S. — 1935 — *J. Am. Med. Ass.*, 104: 1324-29.
- CAMPOS, M. M. — 1929 — Manual Prático de Physiologia, de Pimenta e Melo, Rio de Janeiro, Brasil.
- COURMONT, F. — 1939 — *Presse Med.*, 47 (18): 353-356.
- DESFOSES, P. — 1940 — *Presse Med.*, 48: 661.
- DONALDSON, H. H. — 1915 — The Rat, Data and References Tables, Philadelphia.
- GRASSET, E. M. D. — 1929 — *South African Inst. for Med. Res.* 24 (4): 171-190.
- JACKSON LABORATORY — 1941 — Biology of Laboratory Mouse, Philadelphia, ed. G. D. Snell. 1.^a ed.
- KOLMER, J. A. & BOERNER, F. — 1941 — Approved Laboratory Technic, 3.^a ed.
- LAIGRET, J. M. — 1933 — *C. R. Acad. Sciences*, 196 (7): 508.
- LEVADITI, G. & LEPINE, P. — 1938 — Les Ultravirus des Maladies Humaines, Paris.
- MONTEIRO, J. L. — 1930 — *Brasil Médico*, 44: 1087.
- PAPAIOANNOU, A. — 1938 — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 31 (7): 582.

PAULINO, A. — 1938 — *Acta Médica*, 2:271-281.

PEREIRA, J. R. — 1929 — Manual de Pharmacologia, S. Paulo, Brasil.

RAMON, G., RICHOU, R. & DESCAZEUX, J. — 1935 — *C. R. Soc. Biol.*, 119, 1070.

SOUTO, A. B. & UBISCH, G. VON — 1939 — *Mem. Inst. Butantan*, 12: 313-348.

UBISCH, G. VON & AMARAL, J. P. do — 1935-1936 — *Mem. Inst. Butantan*, 10: 179-189.

WADSWORTH, A. B. — 1939 — Standard Methods, Baltimore.