

ANALGESIA EM MODELO ANIMAL SUPERIOR PARA ORTOPEDIA

Maria Teresa Oliveira¹, José Caeiro Potes², Maria Cristina Queiroga³, José Lopes de Castro⁴, Alfredo Franco Pereira⁵ e Joana da Costa Reis⁶

¹ DMV, ECT, ICAAM, Universidade de Évora, Portugal; teresoliveira@uevora.pt

² DMV, ECT, ICAAM, Universidade de Évora, Portugal; jacpotes@uevora.pt

³ DMV, ECT, ICAAM, Universidade de Évora, Portugal; crique@uevora.pt

⁴ Departamento de Zootecnia, ECT, ICAAM, Universidade de Évora, Portugal; jcastro@uevora.pt

⁵ Departamento de Zootecnia, ECT, ICAAM, Universidade de Évora, Portugal; apereira@uevora.pt

⁶ DMV, ECT, Universidade de Évora, Portugal; CICECO, Universidade de Aveiro, Portugal; jmfer@uevora.pt

PALAVRAS CHAVE: Modelos Animais, Ortopedia, Ovino, Analgesia, Biomateriais.

RESUMO: *O teste de novos biomateriais para aplicações clínicas em ortopedia, ou noutras áreas da medicina, em modelos animais vivos e sencientes, em prol do benefício humano, deve ser objecto de planeamento cuidado e ponderado, dado o conflito ético que se coloca. Compete-nos a nós, enquanto investigadores, garantir que as condições de vida, saúde e bem-estar são asseguradas. O uso de ovinos como modelo superior pré-clínico, para investigação em Ortopedia, tem-se evidenciado devido às suas características translacionais para a espécie humana. Neste estudo retrospectivo deu-se ênfase ao plano anestésico/ analgésico instituído em três tipos de técnicas cirúrgicas ortopédicas, realizadas em ovinos. Os animais intervencionados foram adquiridos com 2 meses de antecedência em relação às cirurgias e mantidos em rebanho, com condições condignas de abrigo e alimentação. As técnicas cirúrgicas inovadoras foram treinadas previamente em peças anatómicas adquiridas no matadouro. Todas as cirurgias e anestésias foram realizadas por médicos veterinários devidamente qualificados. Durante os períodos pós-operatórios os animais foram mantidos no Hospital Veterinário, sob vigilância e tratamento, após o que regressaram ao pasto. Considera-se que os protocolos anestésico e analgésico instituídos foram suficientes para eliminar a dor ortopédica/ neuropática causada pelas técnicas cirúrgicas referidas.*

1 INTRODUÇÃO

O teste de novos biomateriais para aplicações clínicas em ortopedia, ou noutras áreas da medicina, em modelos animais vivos e sencientes, em prol do benefício humano, deve ser objecto de planeamento cuidado e ponderação, dado o conflito ético que se coloca. Existem diversas correntes de pensamento na comunidade científica

internacional, quer a favor quer contra a utilização de animais. Por exemplo, o “Medical Research Modernization Committee” considera que a experimentação animal é movida principalmente por interesses económicos. Mais, afirma que perante as diferenças anatómicas, fisiológicas e patológicas entre humanos e não humanos, a experimentação animal não deve ser considerada um método válido para

investigação médica (1). Em contrapartida, inúmeras evidências mostram que a experimentação animal é, inevitavelmente, uma ferramenta importante para o avanço da ciência, por permitir a observação de processos *in vivo* que, de outra forma, não seriam avaliados (2).

Actualmente a sociedade está sensibilizada para o bem-estar animal, encontrando-se o tema bem documentado e legislado (Directiva 2010/63/EU, Decreto-Lei n° 113/2013, de 7 de Agosto) [3], [4]. Como tal, também a utilização de animais em investigação é abrangida por regras e leis que têm de ser cumpridas. Assim, qualquer projecto que passe pela utilização de modelos animais, desde o ratinho de laboratório ao cão, deverá ser aprovado por um órgão institucional (Comissão de ética), responsável pelo bem-estar dos animais e, posteriormente, submetido à Direcção Geral do Alimentação e Veterinária (DGAV), enquanto autoridade sanitária e veterinária, para obtenção das respectivas autorizações legais. Só deverão ser submetidos projectos com modelos animais se não existirem alternativas “não animais” viáveis. Todos os projectos deverão garantir métodos susceptíveis de proporcionar resultados satisfatórios provocando o mínimo de dor, sofrimento ou angústia ao animal, sendo fixado limites máximos a partir dos quais os animais não podem ser submetidos a mais procedimentos científicos. Todos os procedimentos que causem dor severa, sofrimento ou angústia, susceptíveis de serem prolongados e sem possibilidade de serem aliviados não estão autorizados. Os procedimentos devem ser realizados, quando possível, sob anestesia geral ou local, analgesia ou outro método de contenção adequado, para assegurar que a dor, o sofrimento e a angústia são reduzidos ao mínimo. A morte, como limite crítico de um procedimento, deve ser evitada, e quando necessária deverá ser indolor. O presente decreto-lei prevê, ainda, a realização de

inspecções periódicas aos criadores, fornecedores e utilizadores, que deverão assegurar condições condignas de alojamento e enriquecimento ambiental, capacidade de avaliação da dor, da angústia e do sofrimento infligidos e devido acompanhamento médico-veterinário dos animais.

A legislação em vigência rege-se assaz pelo princípio dos 3R's, de modo a minimizar o uso de animais em investigação científica: “replacement” (substituição), “reduction” (redução) e “refinement” (refinamento) [5], [6], [7]. Sempre que possível, o uso de animais deve ser **substituído** e/ou precedido por modelos computacionais, estudos *in vitro*, estudos em tecidos animais obtidos em matadouros ou tecidos humanos doados, estudos em invertebrados, entre outros. O número de animais deverá ser **reduzido**, entre outros, através do uso da estatística e delineamento experimental apropriados, do uso de animais com características similares de modo a diminuir a variabilidade dos grupos, de estudos *ex vivo*, da utilização de técnicas não invasivas de diagnóstico, como é o caso dos fluorocromos, ecografia e radiografia, que permitem a recolha de informação do mesmo animal em alturas temporais distintas e, quando viável, da colaboração entre investigadores, que poderão retirar dados de um mesmo animal e também da utilização de animais em projectos distintos, em condições excepcionais previstas pela legislação portuguesa. Deverá haver um **refinamento** da metodologia, de modo a minimizar a dor, o sofrimento e a angústia infligidos. Neste ponto é importante referir a experiência e o conhecimento técnico-científico do investigador, de forma a minimizar o impacto negativo sobre o animal. Quando as características e exigências dos projectos forem impeditivas do tratamento de dor e desconforto, devem-se considerar o estabelecimento de limites humanamente aceitáveis (*humane endpoints*), que em

última análise levarão à eutanásia do animal. É ainda de extrema importância todo um conjunto de condições de manejo prestadas aos animais, em conformidade com a legislação vigente e a espécie seleccionada, do alojamento à alimentação e cuidados higienossanitários, que deverão ser instituídos desde a recepção dos animais até ao término do projecto. Deve ter-se em consideração a necessidade dos animais serem recebidos em instalações condignas com alguma antecedência em relação ao período das cirurgias (no mínimo três a quatro semanas) [7], de forma a minimizar a angústia nos animais intervencionados, causada pela deslocação, alojamento e manejo distintivos em relação ao rebanho de origem. Ademais, durante este período, os animais deverão ser vigiados para detecção prévia de qualquer problema existente e, se necessário, serem substituídos.

Por último, fala-se ainda de um quarto “R” – a **responsabilidade**. A responsabilidade do uso dos animais é de todos aqueles que se encontram ligados ao projecto. Logo, compete-nos a nós, investigadores, procurar a redução, substituição e refinamento no projecto que integramos, garantir que as condições de vida, saúde e bem-estar dos animais são asseguradas no período total em que decorre a experiência e estabelecer limites de sofrimento humanamente aceitáveis a partir dos quais a experiência cessa.

O uso de ovinos como modelo superior pré-clínico para investigação biomédica tem-se evidenciado devido às suas características translacionais para a espécie humana, à sua disponibilidade, baixo custo, facilidade de alojamento e manejo e boa homogeneidade, quando seleccionados para a idade, raça e género [8]. Ademais é considerado um bom modelo para investigação ortopédica devido às suas semelhanças anatómicas quando comparado com o modelo humano, relativamente ao tamanho, peso, estrutura

óssea, processo de remodelação óssea e comportamento biomecânico do osso [9], permitindo o uso dos mesmos materiais protéticos [8], [9].

Neste estudo retrospectivo dar-se-á ênfase ao plano anestésico/ analgésico instituído em três tipos de técnicas cirúrgicas ortopédicas, realizadas neste modelo animal superior, o ovino.

2 EXPERIMENTAL

Foram realizadas, no âmbito de projectos distintos, três técnicas cirúrgicas distintas: a) hemi-artroplastia coxofemoral, b) vertebroplastia percutânea e c) artrotomia/ artroplastia medial do joelho. Cada projecto foi submetido à aprovação da Comissão de Ética do Hospital Veterinário da Universidade de Évora (HVUE) e da DGAV. Com dois meses de antecedência adquiriram-se ovelhas fêmeas adultas, de raça Merina Preta, que foram mantidas em rebanho, numa “folha” de pasto exclusiva para o grupo, com condições condignas de abrigo, alimentação e acompanhamento higienossanitário bi-diário. Todas as técnicas cirúrgicas inovadoras foram treinadas previamente em peças anatómicas adquiridas no matadouro e, no caso da vertebroplastia, seleccionadas de forma a serem minimamente invasivas, com acesso percutâneo e recurso à imagiologia, através do uso do fluoroscópio. Antes da cirurgia, com o objetivo de minimizar os riscos de pneumonia por aspiração, os animais foram sujeitos a um jejum de 24 horas, numa boxe do HVUE, onde se juntaram os animais em grupos de dois. O plano anestésico utilizado incluiu pré-medicação com atropina subcutânea (0.05 mg/kg), xilazina intramuscular (0.1 mg/kg), butorfanol intravenoso (0.01 mg/kg) e carprofeno subcutâneo (2 mg/kg); a indução da anestesia realizou-se com tiopental sódico a 5% intravenoso (5-10 mg/kg) e a manutenção com isoflurano volátil a 1-

2,5% com ventilação espontânea. Todos animais foram intubados orogastricamente para prevenir a ocorrência de pneumonias por aspiração. A anestesia foi vigiada por um médico veterinário qualificado, com apoio de um monitor anestésico que avalia a frequências respiratória, a actividade eléctrica cardíaca (ECG), a pressão arterial não invasiva, a pulsoximetria e a capnografia (figura 1).



Fig. 1 Vertebroplastia em ovino com monitorização anestésica adequada.

Os animais intervencionados ao joelho foram, imediatamente após a cirurgia, submetidos a um exame radiológico. Após a recuperação anestésica os animais foram recolhidos, em grupo, numa boxe, onde ficaram alojados durante o período pós-operatório (10 dias), sob vigilância do médico veterinário. A medicação instituída foi analgesia com butorfanol intramuscular (0.15 mg/kg, de 12 em 12 horas, 3 dias), carprofeno subcutâneo (2 mg/kg, uma vez por dia, 7 dias) e antibioterapia, para prevenção de infecções, com amoxicilina/ácido clavulânico subcutâneos (15 mg/kg, uma vez por dia, 7 dias). ~~Quinze dias~~ após a cirurgia foi administrado a cada animal, por via subcutânea, um fluorocromo (calceína verde, 15 mg/kg). Terminado o período pós-operatório as ovelhas regressaram para o rebanho (figura 2). ~~Seis meses após o período das cirurgias~~ será efectuada a eutanásia com tiopental sódico concentrado, que será antecedida ~~em duas semanas~~ pela administração subcutânea de outro fluorocromo (alizarina complexona, 5 mg/kg)



Fig. 2 Ovinos intervencionados em pasto.

3 DISCUSSÃO

A minimização da dor e do desconforto dos animais foi alcançada quer através da terapêutica médica instituída (analgesia e anestesia), quer através das outras medidas preventivas tomadas, referentes ao alojamento e manejo.

Durante todo o trabalho foi dedicada extrema atenção ao manejo dos ovinos. O planeamento temporal do projecto assumiu um papel fulcral, tendo sido tomada em consideração a necessidade dos animais serem recebidos com alguma antecedência em relação ao período das cirurgias (dois meses), de forma a minimizar a angústia nos animais e permitir a detecção prévia de animais doentes ou, por outro motivo, incapazes de serem sujeitos ao procedimento cirúrgico. Durante o período em que decorreu o projecto os animais foram sujeitos a vigilância bidária por técnicos qualificados para a espécie seleccionada, e assim vocacionados para a detecção precoce de problemas, o que se considera uma importante mais-valia para o sucesso do seu tratamento e manejo.

Relativamente ao refinamento das técnicas cirúrgicas, o treino prévio *ex vivo* foi absolutamente relevante, visto que permitiu o aperfeiçoamento das técnicas inovadoras, de modo a minimizar lesões, e consequentemente dor, infligidas ao animal. É ainda de referir a importância dos meios complementares de diagnóstico, como é o caso do fluoroscópio e da radiografia, que

permitiram, por um lado a utilização de técnicas minimamente invasivas (no caso da vertebroplastia percutânea) e por outro a avaliação, em pontos temporais distintos, do processo cirúrgico desenvolvido. Ainda no seguimento deste propósito, considera-se também relevante a administração de fluorocromos, que irão permitir a datação histológica das alterações ósseas ocorridas. O protocolo analgésico utilizado verificou-se suficiente, tendo sido verificado o retorno ao nível de actividade normal, ao fim do período pós-operatório, em todas as ovelhas. Contudo, não inviabiliza a utilização de outros fármacos mais potentes tais como o fentanilo ou o flunixin meglubina, em casos de dor mais severa, de acordo com a avaliação clínica. Citar Grant e White e Taylor

4 CONCLUSÕES

O protocolo analgésico instituído foi suficiente para eliminar a dor ortopédica/neuropática causada pelas técnicas cirúrgicas referidas, pelo que se afigura uma alternativa viável para este tipo de procedimentos.

Não foi nosso propósito neste artigo avaliar tão-somente a acção dos fármacos usados, mas antes sensibilizar os investigadores para uma ciência mais altruísta, responsável e ética.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi suportado pela Comissão Europeia, ao abrigo do Sétimo Programa-Quadro, através do projecto Restoration, ao abrigo da acção “SME-targeted Collaborative project”, grant agreement NMP.2011.2.1-1.

REFERÊNCIAS

[1] *A critical look at animal experimentation*. Medical Research Modernization Committee, 2006

[2] *Why Animal Experimentation Matters: The Use of Animals in Medical Research*. Eds. E.F. PAUL and J. PAUL. Transaction (New Brunswick, USA). 2001. 224 pages.

[3] Directiva 2010/63/EU, Diário Oficial da União Europeia, L276/33-79, 2010, ISSN 1725-2601.

[4] Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de Agosto. Diário da República, 1.ª série — N.º 151. Ministério da Agricultura, do mar, do ambiente e do ordenamento do território, Lisboa.

[5] W. M. S. Russell, R.L. Burch, “The principles of humane experimental technique.” *Methuen & Co. Ltd, London*, P-238, 1959.

[6] SPCAL

[7] Auer, Jorg A., et al. "Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use." *BMC musculoskeletal disorders* 8.1 (2007): 72.

[8] L.M. Benneker, A. Gisepp, J.Krebs, A. Boger, P. F. Heini, V. Boner, “Development of an in vivo experimental model for percutaneous vertebroplasty in sheep”, *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*: Vol. 25, 173–177, 2012.

[9] J.C. Potes, J. Reis, F. Capela e Silva, C. Relvas, A.S. Cabrita, J.A. Simões, “The Sheep as an Animal Model in Orthopaedic Research”, *Experimental Pathology and Health Sciences*, Vol. 2, 29-32, 2008.