

GABRIELE BIN ALVES PEREIRA

**Protocolo anestésico aplicado ao teste de potência NIH de vacinas  
antirrábicas de uso veterinário**

São Paulo

2023

GABRIELE BIN ALVES PEREIRA

**Protocolo anestésico aplicado ao teste de potência NIH de vacinas antirrábicas de uso veterinário**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

**Departamento:**

Patologia

**Área de concentração:**

Patologia Experimental e Comparada

**Orientador:**

Prof. Dr. Enio Mori

**Coorientadora:**

Dra. Karen Miyuki Asano

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4293 FMVZ	<p>Pereira, Gabriele Bin Alves Protocolo anestésico aplicado ao teste de potência NIH de vacinas antirrábicas de uso veterinário / Gabriele Bin Alves Pereira. – 2023. 125 f. : il.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2023.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada. Orientador: Prof. Dr. Enio Mori. Coorientadora: Dra. Karen Miyuki Asano.</p> <p>1. Inoculação intracerebral. 2. Refinamento. 3. Camundongos. 4. Isoflurano. 5. Anestesia dissociativa. I. Título.</p>
--------------	---

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB 7070-8, da FMVZ/USP.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Uso do princípio dos 3 Rs no teste de Potência NIH de vacinas antirrábicas de uso veterinário", protocolada sob o CEUA nº 4337180219 (ID 007753), sob a responsabilidade de **Enio Mori e equipe; Gabriele Bin Alves Pereira; Karen Miyuki Asano; Claudia Madalena Cabrera Mori** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 29/04/2020.

We certify that the proposal "Uso do princípio dos 3 Rs no teste de Potência NIH de vacinas antirrábicas de uso veterinário", utilizing 420 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 4337180219 (ID 007753), under the responsibility of **Enio Mori and team; Gabriele Bin Alves Pereira; Karen Miyuki Asano; Claudia Madalena Cabrera Mori** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/29/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 03/2020 a 03/2022 Área: Patologia Experimental E Comparada

Origem: Não aplicável biotério

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 3 a 5 semanas

Quantidade: 420

Linhagem: Swiss albino

Peso: 11 a 20 g

São Paulo, 06 de novembro de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo





**CERTIFICADO : EMENDA** v26/01/2023

Certificamos que a EMENDA (versão de 26/01/2023) da proposta intitulada "Protocolo anestésico aplicado ao teste de potência NIH de vacinas antirrábicas de uso veterinário", CEUA nº 4337180219 (ID 093171), sob a responsabilidade de **Enio Mori e equipe; Gabriele Bin Alves Pereira; Karen Miyuki Asano; Claudia Madalena Cabrera Mori** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) em 14/02/2023.

Término previsto: 03/2022

Origem: Não aplicável biotério

Espécie: Camundongos heterogênicos sexo: Machos e Fêmeas idade: 3 a 5 semanas Quantidade mantida: 0

Linhagem: Swiss albino Peso: 11 a 20 g

**ANIMAIS UTILIZADOS**

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Camundongos heterogênicos	Machos e Fêmeas	420	0

São Paulo, 14 de fevereiro de 2023

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo





SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO PASTEUR  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



São Paulo, 20 de abril de 2022.

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Protocolo anestésico aplicado ao teste de potência NIH de vacinas antirrábicas de uso veterinário”, registrada com o número 02.2022, sob a responsabilidade do pesquisador **Dr. Enio Mori**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto Pasteur (CEUA-IP) em reunião de 20/04/2022.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/2022 a 04/2023
Espécie/ linhagem	Mus musculus/ Swiss
Nº de animais	110 animais
Peso/ idade	Aprox. 25g/ 05 semanas
Sexo	Fêmeas e machos
Origem	Biotério Instituto Pasteur

Karen Miyuki Asano  
Coordenadora CEUA-IP  
Biênio 2021 - 2022

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PEREIRA, Gabriele Bin Alves

Título: Protocolo anestésico aplicado ao teste de potência NIH de vacinas antirrábicas de uso veterinário

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais, pelos valores que me ensinaram e por todo o empenho em me ajudarem na construção do que sou hoje.

Dedico ao João pela confiança, pelo apoio incondicional e pela tolerância com meus momentos de ausência.

Dedico a Mônica pelo suporte nas conversas com a minha mente e por me ajudar a evoluir.

Dedico a tia Tude por sempre ter aberto as portas do apartamento para mim quando precisei de um porto seguro em São Paulo.

Dedico aos animais, o principal motivo de toda a minha trajetória profissional.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Karen por ter me acompanhado nos experimentos, pelo apoio e conhecimento passado. Obrigada pelo tempo dedicado mesmo aos fins de semana e feriados.

Agradeço ao prof. Enio por ter me aceito como orientada e pelas sábias correções a esta tese.

Agradeço também à Claudia pelas contribuições e pelo acompanhamento da trajetória nos bastidores.

Agradeço aos colaboradores do biotério do Instituto Pasteur pelos cuidados com os animais dos experimentos que realizei.

Obrigada a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, a tornar esse projeto de vida, uma realidade.

Agradeço a cada professor que tive desde os primeiros anos de estudo, cada um à sua forma contribuiu para a minha jornada acadêmica e profissional.

## RESUMO

PEREIRA, G.B.A. **Protocolo anestésico aplicado ao teste de potência NIH de vacinas antirrábicas de uso veterinário**. 2023. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O teste de potência de NIH é utilizado na rotina de avaliação da eficácia de vacinas antirrábicas inativadas de uso veterinário, sendo considerado o teste oficial no Brasil. Uma etapa crítica é a inoculação do vírus rábico pela via intracerebral em camundongos, procedimento com grau de invasividade grave (com alta intensidade de dor e estresse) e que requer o uso prévio de anestesia e analgesia. O presente estudo teve como principal objetivo o desenvolvimento de um protocolo anestésico injetável eficaz, seguro, aplicável ao teste de NIH. Adicionalmente, comparar este procedimento injetável com a anestesia inalatória em relação ao desempenho e custos de insumos, equipamentos e mão de obra. Para isso, o trabalho foi dividido em duas partes, denominadas experimentos 1 e 2. No experimento 1 foram avaliados três protocolos anestésicos injetáveis [G1 (100 mg/kg Cetamina + 10 mg/kg Xilazina + 1 mg/kg Acepromazina + 5 mg/kg Tramadol), G2 (100 mg/kg Cetamina + 8 mg/kg Xilazina + 1 mg/kg Acepromazina + 5 mg/kg Tramadol) e G3 (50 mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8 mg/kg Xilazina + 5 mg/kg Tramadol)] quanto aos critérios de segurança (ausência de mortalidade dos animais), eficácia (sucesso na indução  $\geq 80\%$  e duração de anestesia cirúrgica  $>16$  minutos), praticidade (realizado sem a necessidade de reaplicação) e que contribuísse para o bem-estar dos animais (ganho de peso no período após 7 dias). Além disso, os camundongos anestesiados com os protocolos G1, G2 ou G3 foram avaliados quanto aos reflexos (postural, caudal e podal), temperatura corpórea, movimentos respiratórios por minuto e eventos adversos (sialorreia, cianose, vocalização e outros). O protocolo que atendeu aos critérios foi do grupo G3. No experimento 2 foi realizado um estudo comparativo entre os protocolos injetável G3 e o inalatório (G4: 1 mg/kg Acepromazina + 5 mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5 L/min para indução e 2,5% - 0,5 L/min para manutenção) previamente a inoculação intracerebral com diferentes concentrações do vírus fixo da raiva (CVS/31), como simulação ao teste de NIH. Para tanto, foram avaliados o tempo gasto nas atividades, os custos e influência no título viral. Ambos os protocolos foram satisfatórios quanto à eficácia e segurança e não houve impacto dos mesmos sobre o título viral, sendo, portanto, adequados para a implantação na rotina de testes de NIH. O protocolo injetável demanda mais tempo para a realização para acompanhamento da recuperação dos animais, mas não requer equipamentos sofisticados e, dessa forma, permite a composição de equipes múltiplas trabalhando simultaneamente. Por

outro lado, a anestesia inalatória demanda menos tempo, mas é menos flexível para composição de equipes, devido a limitação de lotação do equipamento, não permitindo intervenções anestésicas concomitantes. Como ambos os procedimentos implicam maior tempo para a realização do teste de NIH, comparativamente ao que era realizado (não uso de anestesia), é necessária a avaliação do dimensionamento das equipes e adequação da quantidade de vacinas testadas por dia, de acordo com a capacidade de lotação do biotério de experimentação.

Palavras-chave: Inoculação intracerebral. Refinamento. Camundongos. Isoflurano. Anestesia dissociativa.

## ABSTRACT

PEREIRA, G.B.A. **Anesthetic protocol applied to the NIH potency test of rabies vaccines for veterinary use.** 2023. 125f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The NIH potency test is used in the routine evaluation of the effectiveness of inactivated anti-rabies vaccines for veterinary use, being considered the official test in Brazil. A critical step is the intracerebral inoculation of the rabies virus in mice, a procedure with a severe degree of invasiveness (with high intensity of pain and stress) and which requires the prior use of anesthesia and analgesia. The main objective of the present study was to develop an effective, safe injectable anesthetic protocol applicable to the NIH test. Additionally, compare this injectable procedure with inhalatory anesthesia in terms of performance and costs of inputs, equipment, and labor. For this, the work was divided into two parts, called experiments 1 and 2. In experiment 1, three injectable anesthetic protocols were evaluated [G1 (100 mg/kg Ketamine + 10 mg/kg Xylazine + 1 mg/kg Acepromazine + 5 mg/kg Tramadol), G2 (100 mg/kg Ketamine + 8 mg/kg Xylazine + 1 mg/kg Acepromazine + 5 mg/kg Tramadol) and G3 (50 mg/kg Thiletamine/zolazepam + 8 mg/kg Xylazine + 5 mg/kg Tramadol)] regarding safety criteria (absence of animal mortality), efficacy (successful induction  $\geq 80\%$  and duration of surgical anesthesia  $>16$  minutes), practicality (performed without the need for reapplication) and that it contributes to the good -being of the animals (weight gain in the period after 7 days). In addition, mice anesthetized with protocols G1, G2 or G3 were evaluated for reflexes (postural, caudal and foot), body temperature, respiratory movements per minute and adverse events (sialorrhea, cyanosis, vocalization and others). The protocol that met the criteria was for the G3 group. In experiment 2, a comparative study was carried out between the G3 injectable and the inhaled protocols (G4: 1 mg/kg Acepromazine + 5 mg/kg Tramadol + 5% Isoflurane - 0.5 L/min for induction and 2.5% - 0.5 L/min for maintenance) prior to intracerebral inoculation with different concentrations of fixed rabies virus (CVS/31), as a simulation of the NIH test. To this end, the time spent on activities, costs and influence on the viral titer were evaluated. Both protocols were satisfactory in terms of efficacy and safety and had no impact on viral titer, therefore being suitable for implementation in routine NIH testing. The injectable protocol requires more time to perform to monitor the recovery of the animals, but does not require sophisticated equipment and, therefore, allows the composition of multiple teams working simultaneously. On the other hand, inhalational anesthesia takes less time, but is less flexible for team composition, due to limited equipment capacity, not allowing concomitant

anesthetic interventions. As both procedures involve more time to carry out the NIH test, compared to what was done (no use of anesthesia), it is necessary to evaluate the dimensioning of the teams and adequacy of the number of vaccines tested per day, according to the capacity of capacity of the experimentation vivarium.

**Keywords:** Intracerebral inoculation. Refinement. Mice. Isoflurane. Dissociative anesthesia.

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Gráfico de casos de raiva humana de acordo com a espécie agressora no período de 2010 a 2022..... 31
- Gráfico 2 - Quantidade de vacinas antirrábicas de uso veterinário indicadas por espécie no Brasil no ano de 2022 ..... 37
- Gráfico 3 - Representação da média e o erro padrão média do tempo de indução em minutos (min). Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey ..... 73
- Gráfico 4 - Representação da média e o erro padrão média do tempo de anestesia cirúrgica em minutos (min). Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey ..... 74
- Gráfico 5 - Representação da média e o erro padrão média do tempo de recuperação em minutos (min). Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey. Letras diferentes significam  $p < 0,05$  ..... 75
- Gráfico 6 - Representação da média e o erro padrão média do tempo total de indução, cirurgia e recuperação em minutos (min). Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey ..... 76

Gráfico 7 - Representação gráfica dos movimentos respiratórios por minuto (MPM). As avaliações foram realizadas a cada 5 minutos durante uma hora dos animais submetidos aos protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) .....	77
Gráfico 8 - Representação da média e o erro padrão temperatura corporal média em graus celsius (°C). Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey. Letras diferentes significam $p < 0,05$ .....	79
Gráfico 9 - Peso médio diário das fêmeas de acordo com o grupo experimental, no período de dia 0 (D0) ao dia 7 (D+7) .....	80
Gráfico 10 - Peso médio diário dos machos de acordo com o grupo experimental, no período do dia 0 (D0) ao dia 7 (D+7) .....	81
Gráfico 11 - Representação da média e o erro padrão da média do ganho de peso em gramas (g) após sete dias de realização da anestesia de todos os animais (n = 10 animais por grupo). Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey .....	82
Gráfico 12 - Representação da média e o erro padrão da média do ganho de peso em gramas (g) após sete dias de realização da anestesia de todos os animais (n = 5 ♀, 5 ♂ por grupo). Comparação entre os sexos realizados pelo teste t de student .....	83
Gráfico 13 - Porcentagem de tempo gasto para realização de cada etapa do procedimento nos grupos G3 II e G4 (n = 21 animais por grupo) .....	99

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de sucesso na indução anestésica, porcentagem de anestesia cirúrgica e média e erro padrão dos tempos anestésicos para cada grupo experimental de dez animais. Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey .....	72
Tabela 2 - Movimentos respiratórios por minuto (MPM) mínimo, máximo, médio e desvio padrão para cada grupo experimental durante o período anestésico .....	77
Tabela 3 - Temperatura ambiente e umidade relativa registrados na cidade de São Paulo nos momentos D0.....	78
Tabela 4 - Temperatura corpórea (°C) mínima, máxima e média e erro padrão para cada grupo experimental durante o período anestésico. Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey .....	78
Tabela 5 - Peso médio das fêmeas de acordo com o grupo experimental, no período de dia 0 (D0) ao dia 7 (D+7) .....	79
Tabela 6 - Peso médio dos machos de acordo com o grupo experimental, no período de dia 0 (D0) ao dia 7 (D+7) .....	80
Tabela 7 - Ganho de peso médio (g), após sete dias de realização da anestesia, de acordo com o grupo experimental. Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey .....	81
Tabela 8 - Eventos adversos observados durante o período anestésico de acordo com o grupo experimental .....	84

Tabela 9 - Tempo gasto para a realização da anestesia, inoculação intracerebral e acompanhamento da recuperação de 21 animais por grupo de G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) e G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção).....	98
Tabela 10 - Cálculos de custo de insumo para a realização do procedimento de pesagem, anestesia e inoculação intracerebral para os grupos experimentais G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) e G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção).....	100
Tabela 11 - Cálculo de custo de mão de obra para a realização do procedimento de pesagem, anestesia e inoculação intracerebral para os grupos experimentais G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) e G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção).....	101
Tabela 12 - Cálculo do custo do procedimento anestésico para o teste de NIH considerando os protocolos dos grupos G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) e G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção).....	102
Tabela 13 - Custos de equipamentos de anestesia inalatória para camundongos.....	102
Tabela 14 - Titulação do vírus fixo CVS/31 nos grupos G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) e G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção).....	103
Tabela 15 - Cálculo do título viral em LOG DL <sub>50</sub> /mL utilizando o método de Reed e Muench (1938) para o grupo G3 II (n = 7 animais por diluição) .....	103
Tabela 16 - Cálculo do título viral em LOG DL <sub>50</sub> /mL utilizando o método de Reed e Muench (1938) para o grupo G3 4 (n = 7 animais por diluição) .....	103
Tabela 17 - Volume de solução anestésica administrada para o grupo G1(100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) .....	121
Tabela 18 - Volume de solução anestésica administrada para o grupo G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) .....	122
Tabela 19 - Volume de solução anestésica administrada para o grupo G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) .....	123

Tabela 20 - Volume de solução anestésica administrada para o Grupo G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) .....	124
Tabela 21 - Volume de solução anestésica (acepromazina + tramadol) administrada para o Grupo G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção) .....	125

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Casos de raiva animal no Brasil de acordo com a espécie e região em 2022 .....	33
Quadro 2 - Vacinas antirrábicas de uso veterinário registradas no Brasil no ano de 2022, em relação a indicação de espécie e fabricante .....	37
Quadro 3 - Protocolo anestésico de acordo com o grupo experimental .....	65
Quadro 4 - Protocolo anestésico de acordo com o grupo experimental .....	92
Quadro 5 - Classificação de sinais clínicos em camundongos da linhagem <i>Swiss Webster</i> compatíveis com raiva avaliados no período do dia 0 (D0) ao dia 14 (D+14) pós-inoculação com vírus fixo CVS/31 .....	97

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>25</b>
2.1.	VÍRUS DA RAIVA.....	<b>25</b>
2.1.1.	Ciclo da doença.....	27
2.1.2.	Importância econômica.....	29
2.2.	VACINAS .....	<b>34</b>
2.2.1.	Tipos .....	34
2.2.2.	Controle de Qualidade .....	38
2.2.3.	Resultados fora da especificação .....	40
2.2.4.	Processo produtivo .....	41
2.2.5.	Testes de controle de qualidade .....	42
2.2.6.	Fatores que interferem nos testes de controle de qualidade.....	43
2.3.	NIH.....	<b>50</b>
2.3.1.	Técnica.....	50
2.3.2.	História .....	51
2.4.	3Rs NOS TESTES DE VACINAS .....	<b>53</b>
2.4.1.	Redução (do inglês <i>Reducing</i> ).....	53
2.4.2.	Refinamento (do inglês <i>Refining</i> ).....	54
2.4.3.	Substituição (do inglês <i>Replacement</i> ).....	55
2.4.4.	Melhorias nas técnicas diagnóstico de raiva .....	56
<b>2.5.</b>	<b>PROTÓCOLOS ANESTÉSICOS EM CAMUNDONGOS.....</b>	<b>57</b>
2.5.1.	Injetáveis .....	58
2.5.2.	Inalatórios .....	61
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>63</b>
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	<b>63</b>
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	<b>63</b>
<b>4.</b>	<b>EXPERIMENTO 1</b> .....	<b>64</b>
4.1.	INTRODUÇÃO.....	<b>64</b>
4.2.	MATERIAIS E MÉTODOS DO EXPERIMENTO 1.....	<b>65</b>
4.2.1.	Delineamento experimental .....	65
4.2.2.	Administração .....	65
4.2.3.	Seleção dos animais .....	66

4.2.4. Critérios de inclusão .....	66
4.2.5. Critérios de exclusão .....	67
4.2.6. Aclimatação .....	67
4.2.7. Identificação .....	67
4.2.8. Destino dos animais .....	67
4.2.9. Eutanásia .....	67
4.2.10. Alojamento .....	68
4.2.11. Cuidados durante o período anestésico .....	68
4.2.12. Parâmetros para avaliação do protocolo anestésico.....	68
4.2.13. Análise estatística.....	70
4.3. RESULTADOS DO EXPERIMENTO 1 .....	<b>72</b>
4.3.1. Monitoramento do plano anestésico .....	72
4.3.2. Frequência respiratória .....	76
4.3.3. Temperatura corpórea .....	77
4.3.4. Ganho de peso no período experimental de dia 0 (D0) ao dia 7 (D+7) .....	79
4.3.5. Eventos adversos.....	83
4.4. DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO 1.....	<b>85</b>
4.5. CONCLUSÕES DO EXPERIMENTO 1 .....	<b>90</b>
5. EXPERIMENTO 2.....	91
5.1. INTRODUÇÃO.....	<b>91</b>
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS DO EXPERIMENTO 2 .....	<b>92</b>
5.2.1. Delineamento experimental .....	92
5.2.2. Administração.....	92
5.2.3. Desafio pela via intracerebral .....	93
5.2.4. Seleção dos animais .....	93
5.2.5. Critérios de inclusão .....	94
5.2.6. Critérios de exclusão .....	94
5.2.7. Aclimatação.....	94
5.2.8. Identificação .....	94
5.2.9. Destino dos animais .....	94
5.2.10. Eutanásia .....	94
5.2.11. Alojamento .....	95
5.2.12. Cuidados durante o período anestésico .....	95
5.2.13. Parâmetros avaliados .....	95

5.3.	RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2 .....	<b>98</b>
5.3.1.	<b>Tempo gasto na atividade</b> .....	98
5.3.2.	<b>Custo</b> .....	99
5.3.3.	<b>Título viral</b> .....	102
5.4.	DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO 2.....	104
5.5.	CONCLUSÕES DO EXPERIMENTO 2.....	109
6.	<b>CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	110
7.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	111
APÊNDICE A - Volume de solução anestésica administrada aos grupos experimentais – Experimento 1 .....		
		121
APÊNDICE B - Volume de solução anestésica aplicada aos grupos experimentais G3 II e G4 pela via intraperitoneal – Experimento 2.....		
		124

## 1. INTRODUÇÃO

As vacinas veterinárias antirrábicas, antes de serem aprovadas e liberadas para comercialização, são avaliadas por uma equipe técnica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em uma das unidades que compõem sua rede laboratorial, o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA). Todos os lotes e partidas das vacinas elaboradas no país ou importadas são submetidas a testes de potência (eficiência), inativação viral (pesquisa de vírus residual), pH, inocuidade e controle de esterilidade, entre outros, para averiguação dos padrões de qualidade requeridos pela legislação vigente (Portaria n° 228 de 25 de outubro de 1988 do MAPA).

O ensaio de potência preconizado oficialmente como padrão-ouro para avaliação de vacinas inativadas de uso veterinário no Brasil, tradicionalmente realizado em camundongos, é o NIH, que é realizado tanto pelos laboratórios oficiais (LFDA), quanto pelas indústrias farmacêuticas produtoras de vacinas (Portaria n° 228 de 25 de outubro de 1988 do MAPA).

Foi desenvolvido originalmente pelos Institutos Nacionais da Saúde dos Estados Unidos da América (em inglês *National Institutes of Health*) na década de 1950, e devido a isso é conhecido como Teste de NIH (SCHIFFELERS *et al.*, 2014).

É baseado na comparação dos resultados de Dose Efetiva 50% (DE<sub>50%</sub>) da vacina teste e da vacina referência após o desafio dos camundongos vacinados com uma concentração pré-determinada do vírus de desafio (CVS - *Challenge virus standard*) via inoculação intracerebral. Para isto, 168 camundongos recém-desmamados são divididos em 8 grupos de 16 animais vacinados e quatro grupos de animais não vacinados (testemunho). A vacina teste e a vacina de referência são administradas pela via intraperitoneal em quatro diluições diferentes (1:5, 1:25, 1:125, 1:625) em cada grupo no dia 0 (D0) e dia 7 (D+7) pós-inoculação (duas aplicações). No dia 14 (D+14) todos os animais são inoculados pela via intracerebral com vírus CVS/35 com uma diluição de desafio, que seja capaz de causar a mortalidade de 100% dos animais não vacinados (testemunhos). Esse título deve estar entre 10 e 100 dose letal 50 (DL<sub>50</sub>). Os animais são observados por mais 14 dias após a inoculação (D+28), momento em que o teste será concluído. De acordo com o resultado, a DE<sub>50%</sub> é calculada por programas (*softwares*) específicos e a vacina é aprovada quando a potência relativa foi maior ou igual a 1,00 UI/dose.

O teste sabidamente possui alta variabilidade nos resultados de 25% a 400% (BRUCKNER *et al.*, 2003), além do uso de muitos animais e da dor causada aos mesmos, pela inoculação intracerebral do vírus fixo da raiva (com conseqüente aumento da pressão intracraniana) e pela manifestação dos sinais clínicos da raiva.

Em virtude do alto custo dos testes e do uso de muitos animais, mesmo que através de instruções dos Órgãos Oficiais como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é imprescindível que haja esforços para melhoria das técnicas, principalmente pelo uso do princípio dos 3Rs seja para refinar (*Refinement*), reduzir o número de animais (*Reduction*) ou substituir as técnicas por um método alternativo (*Replacement*). O refinamento do estudo proposto se trata da redução da dor e desconforto animal. Isso pode ser alcançado com uso de anestésicos e analgésicos (MAJEROWICZ, 2008).

O procedimento de inoculação intracerebral e avaliação de potência vacinal (NIH) são caracterizados como Grau de invasividade grave (G3/G4), pois as alterações causadas pelo teste são progressivas e persistentes culminando com a morte (Resolução n°55 de 5 de outubro de 2022 do CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e geralmente realizado sem anestesia prévia na realidade brasileira. Este trabalho visa preconizar um protocolo anestésico seguro e viável do ponto de vista de tempo de realização para que seja empregado previamente à inoculação dos animais, com intuito de adequar o uso de animais na legislação vigente.

Os protocolos anestésicos são recomendáveis previamente aos procedimentos que podem causar dor ao animal, dada a dificuldade de avaliação da dor nos animais. Algumas vezes sentir dor é extrapolado para o que seria para a espécie humana. A dor altera funções fisiológicas, bioquímicas e comportamentais que são indesejáveis tanto para os animais quanto para avaliação dos resultados dos estudos científicos. Aliviar a dor proporciona ao animal o retorno rápido à homeostasia após o procedimento (CONCEA, 2019).

A seleção do protocolo anestésico deve considerar as particularidades do animal, como espécie, linhagem, idade, além de aspectos intrínsecos ao procedimento como grau de invasividade, duração, se há medicamentos que podem interferir negativamente no teste e também equipe técnica capacitada para executar o procedimento (CONCEA, 2019).

Desta forma, considerando que apesar das variabilidades encontradas no procedimento de NIH, este ainda é o teste oficial para avaliação da potência de vacinas antirrábicas no Brasil, então é fundamental que seja conduzido garantindo o bem-estar

animal e de acordo com as recomendações pertinentes e compatíveis com o grau de invasividade que ocorre no teste. O presente estudo se justifica pela busca de um protocolo anestésico injetável que seja viável, com anestesia cirúrgica adequada e comparável a anestesia inalatória para utilização previamente à inoculação intracerebral.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. VÍRUS DA RAIVA

O vírus da raiva pertence ao filo *Negarnaviricota*, subfilo *Haploviricotina*, classe *Monjiviricetes*, ordem *Mononegavirales*, subfamília *Alpharhabdovirinae* e família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. Atualmente compreende 17 espécies (ICTV, 2023) sendo que a espécie predominante nos casos de raiva é *Lyssavirus rabies*, em que se baseiam todas as vacinas de uso humano e veterinário (RUPPRECHT; FOOKS; ABELARIDER, 2018).

Acomete seres humanos e animais causando uma encefalomielite viral, fatal em aproximadamente 100% das vezes, sendo considerada a mais letal de todas as doenças conhecidas (MORI, 2020). Está distribuído mundialmente (exceto algumas ilhas e Antártida) e, embora todos os homeotérmicos possam albergar o vírus, inclusive as aves, os principais reservatórios são os mamíferos como carnívoros e morcegos (WUNNER; CONZELMANN, 2020).

O vírus possui morfologia de bala ou projétil com medidas aproximadas de 130 a 250 nm de comprimento por 60 a 100 nm de diâmetro, com uma extremidade arredondada e outra plana, um nucleocapsídeo que contém um RNA de, aproximadamente 12 kilobases, de fita simples, não segmentado, de sentido negativo, firmemente unido a nucleoproteínas (N), fosfoproteínas (P) e polimerase viral (L). Possui um envelope viral bilipídico espiculado em que cada espícula é composta por um trímero de proteína G, a qual é capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (MORI, 2020; WUNNER; CONZELMANN, 2020).

O vírus possui as nucleoproteínas que o protege da ação das ribonucleases, enquanto que as fosfoproteínas interagem com o sistema de transporte intracelular para proporcionar a movimentação dos componentes virais e a proteína M auxilia no processo de evaginação da célula do hospedeiro (WUNNER; CONZELMANN, 2020).

O ciclo de vida do vírus da raiva pode ser dividido em três fases, sendo a primeira, adsorção viral, o momento em que o vírus se liga ao receptor da célula susceptível do hospedeiro através das proteínas G, se funde com a membrana plasmática e adentra o hospedeiro por endocitose. Na segunda fase, desnudamento viral, o vírus perde o capsídeo e a fita simples de RNA, que inicialmente era firmemente helicoidal, perde essa estrutura e se torna mais frouxa, permitindo a transcrição e replicação do genoma viral e a síntese

das proteínas virais. A última fase, eclosão viral, consiste na reestruturação do RNA em forma helicoidal com estruturas firmemente compactadas e posterior formação do envelope bilipídico e saída da célula infectada (WUNNER; CONZELMANN, 2020).

A infecção geralmente ocorre através da mordedura do animal infectado (via percutânea), após o contato da saliva contaminada com o vírus da raiva alcançar os nervos periféricos e posteriormente o sistema nervoso central. Também pode ocorrer a infecção por arranhadura e lambedura da pele lesionada ou pelo contato direto da saliva contaminada com a mucosa íntegra (via transmucosa) (MORI, 2020). A transmissão viral por outras formas distintas é extremamente rara, mas já houve relatos de ingestão de carne proveniente de animais contaminados, transplantes de tecidos e órgãos, contaminação da mucosa oral (com feridas prévias), exposição a aerossóis em condições de manipulação do vírus em laboratório e em exploração de cavernas densamente povoadas (com mais de 15 milhões) com morcegos infectados (WALLACE; BLANTON, 2020).

O período de incubação é bastante variável, de 3 semanas a 3 meses após a exposição, sendo que a duração pode ser influenciada pela quantidade de vírus presente, se o vírus foi inoculado próximo a regiões com maior inervação (como extremidades de membros) ou na região da cabeça (próximo do sistema nervoso central - SNC), variante viral, espécie (tipo de hospedeiro terminal ou reservatório), resposta imune do hospedeiro, entre outras (WALLACE; BLANTON, 2020).

A principal fonte de excreção do vírus rábico é através da saliva, porém a detecção é intermitente e o início da excreção viral é variável entre as diferentes espécies animais (WALLACE; BLANTON, 2020).

A transmissão pode ocorrer entre espécies caracterizadas como reservatório ou não e pode ser variável de acordo com a variante do vírus rábico envolvida e conforme a ecologia local (WALLACE; BLANTON, 2020).

Dentre as maneiras que o vírus da raiva permanece no hospedeiro, está a capacidade de ficar em locais do organismo que dificultam o acesso do sistema imune, tais como o sistema nervoso. O SNC é considerado um sítio imunologicamente privilegiado, devido a suas características constitucionais, como a presença de uma barreira hematoencefálica. Além disso, ele é capaz de se multiplicar no local de inoculação, como na musculatura e pode penetrar nos neurônios da inervação periférica via junção neuromuscular. Possui mecanismo de transporte axonal e pode ser transmitido entre neurônios através de transporte sináptico retrógrado, mecanismos para evadir da atuação do sistema imune e prevenir que ele adentre o sistema nervoso através da barreira

hematoencefálica (WUNNER; CONZELMANN, 2020). O local de maior concentração viral é a medula oblonga ou bulbo, de onde é transportado para glândulas salivares, o que possibilita a infecção de outros seres vivos através da mordedura (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDER, 2018).

Uma vez atingindo o SNC, o tronco encefálico é o local de eleição para diagnóstico da raiva, devido a alta replicação e maior concentração viral nesta região. A seguir ocorre a disseminação viral de maneira centrífuga, do SNC para os órgãos e tecidos periféricos, como glândulas salivares e folículos pilosos (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDER, 2018).

A proteína G é fundamental para que o vírus tenha capacidade de infecção tanto *in vitro* quanto *in vivo*, assim, as características da mesma determinam a capacidade de neuroinvasão e virulência (WUNNER; CONZELMANN, 2020).

As inclusões intracitoplasmáticas são denominadas corpúsculos de Negri, característicos de infecções por *Lyssavirus*, são correspondentes as ribonucleoproteínas produzidas pelos vírus e que podem ser visualizados no microscópio óptico e por imunofluorescência direta (utilizando anticorpos marcados por fluoresceína) (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDER, 2018).

Ao infectar os humanos, os sintomas duram de 1 a 2 semanas e culminam indubitavelmente com a morte. Os primeiros sintomas prodrômicos não são patognomônicos, tais como febre e mal-estar. Com a evolução observa-se algumas vezes parestesia e formigamento no local acometido, progressivamente há encefalite e sintomas neurológicos, podendo haver alucinações e delírios. A morte ocorre em geral por falência respiratória ou cardíaca. São extremamente raros os casos de sobreviventes, uma vez que o quadro neurológico esteja estabelecido (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDER, 2018).

### **2.1.1. Ciclo da doença**

Todos os mamíferos são susceptíveis a infecção pelo vírus da raiva, mas o destaque na manutenção e propagação da doença, atuando como reservatórios, estão relacionados aos carnívoros (domésticos e selvagens) e animais da ordem *Chiroptera* (morcegos de diversos hábitos alimentares) (MORI, 2020). Há a possibilidade de transmissão entre espécies, o que é denominado transposição ou *spillover*, o que no caso

da raiva apresenta uma evolução rápida e seguida do óbito da nova espécie infectada (MORI, 2020).

Há 12 variantes antigênicas do vírus da raiva que são determinadas por um painel de anticorpos monoclonais do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), de acordo com o hospedeiro natural. No Brasil houve detecção e identificação de cinco variantes: AgV1 e AgV2 (cão doméstico), AgV3 (morcego hematófago - *Desmodus rotundus*), AgV4 (morcego insetívoro - *Tadarida brasiliensis*) e AgV6 (morcego insetívoro - *Lasiurus cinereus*) e ainda há duas variantes que não foram possíveis caracterizar através do painel do CDC e que foram detectadas em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e em sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) (Ministério da Saúde, 2019).

O ciclo da doença pode ser dividido em doméstico, silvestre terrestre e silvestre aéreo. Sendo o cão o principal reservatório do ciclo doméstico transmitindo para o ser humano o vírus da raiva (variantes AgV1 na região fronteira com a Bolívia e AgV2 na região Nordeste do Brasil) pela via percutânea (mordedura ou arranhadura). Neste ciclo, o gato é considerado um hospedeiro terminal e casos recentes demonstram a infecção dessa espécie com as variantes de morcego, indicando um *spillover*, principalmente em regiões do Brasil como o Sul, onde a raiva canina está controlada (RIBEIRO *et al.*, 2018). A infecção neste caso se deve ao instinto predador do gato e à menor ocorrência de vacinação dessa espécie em relação aos cães, tornando-os mais suscetíveis (MORI, 2020).

A variante da raiva dos morcegos, AgV3 é proveniente de morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) ou frugívoros (gênero *Artibeus* sp) e, eventualmente podem infectar os gatos, sendo que estes últimos podem transmitir a doença para os seres humanos, com esta variante associada a quirópteros, como um ciclo secundário (MORI, 2020).

O ciclo silvestre aéreo compreende o morcego hematófago – *Desmodus rotundus*, que infecta os animais de produção rural, tais como grandes e pequenos ruminantes e suínos, o que se torna mais acentuado, com aumento dos casos de raiva decorrente do aumento da população desses quirópteros, quando há desmatamento de florestas para criação de pastos para a pecuária. De modo raro e secundário, os animais de produção podem transmitir a raiva para os seres humanos em casos de profissionais que manipulam estes animais contaminados, como veterinários e tratadores, desprovidos de esquema vacinal pré-exposição. Já as ocorrências de raiva humana transmitidas por quirópteros são esporádicas e geralmente estão relacionadas a desequilíbrios ambientais, em especial nas populações ribeirinhas da região amazônica (MORI, 2020) e também favorecido pela

proximidade das áreas silvestres das áreas urbanas, o que facilita a migração dos morcegos para os centros urbanos, em busca de alimento, principalmente em épocas mais quentes quando se tornam mais ativos (RIBEIRO *et al.*, 2018). Ainda, na região amazônica, o controle da contaminação com o vírus da raiva e consequente *spillover* para os humanos se torna mais difícil devido a desigualdade do acesso às políticas públicas de saúde, o que inclui o acesso às vacinas antirrábicas tanto na profilaxia pré quanto pós-exposição (BASTOS *et al.*, 2021).

No ciclo silvestre terrestre são reservatórios o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e o sagui-do-tufo-branco (*Callythrix jacchus*), pois em algumas regiões (Nordeste do Brasil) são considerados animais sinantrópicos, de convivência próxima com o ser humano (semi-domiciliados), sendo possível a transmissão tanto para o homem quanto para os animais domésticos (MORI, 2020).

### **2.1.2. Importância econômica**

Em relação à raiva humana no mundo, sabe-se que mais de 99% dos casos de infecção são mediados pelo cão causando cerca de 59.000 mortes por ano, a um custo estimado de US\$ 8,6 bilhões por ano, ainda mais de 95% dos casos ocorrem na África e Ásia, mais de 80% dos casos ocorrem em áreas rurais com acesso precário à saúde. É considerada 100% prevenível e as vacinas antirrábicas para cães podem controlar com eficiência a doença em uma população como sua fonte de infecção, sendo possível tornar uma região livre de raiva de variantes caninas (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2021).

A vacinação antirrábica dos animais domésticos de companhia representa uma medida de prevenção de casos de raiva humana, desta forma em alguns países, tais como o Brasil, a imunização em massa de cães e gatos foi até o ano de 2019 uma prática comum (Nota técnica 01 de 24 de novembro de 2020 da Secretaria de Saúde, 2020). No estado de São Paulo, em virtude dessas massivas campanhas de vacinação, os últimos casos registrados de raiva humana e de cães causados pelas variantes caninas ocorreram em 1997 e 1998, respectivamente. Desde então, todos os casos registrados de raiva em cães e gatos são causados por variantes virais originárias de morcegos. Diante deste cenário, as campanhas de vacinação em massa realizadas em um determinado período do ano foram substituídas por imunização em postos fixos permanentes promovidos durante o ano (Deliberação CIB nº 169 de 15 de dezembro de 2021, Ministério da Saúde, 2021).

A vacinação do rebanho de animais de produção também é importante no controle da raiva nesses animais, em especial em situações de surtos epizooticos causados por mordeduras de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, de acordo com as recomendações do Manual técnico de controle da raiva dos herbívoros (MAPA, 2009).

No Brasil, nas décadas de 1980 e 1990 o cão era considerado o principal transmissor do vírus da raiva, o que foi alterado (com diminuição da sua ocorrência) principalmente após a adoção das campanhas de vacinação em massa nas populações canina e felina. Dessa forma, a partir de 2004 foi observado mudança do perfil epidemiológico da raiva, sendo que o morcego passou a ser considerado o principal transmissor do vírus no país. A maior ocorrência de casos de raiva humana foi nas regiões Norte e Nordeste do país (Mapa 1).

Em estudo retrospectivo realizado por Gonçalves, Soares e Santos (2018) verificou-se que ao longo dos anos os casos de raiva humana e animal reduziram drasticamente, o que possivelmente levou à diminuição da vacinação animal, por crer que a doença não ocorreria mais no país.

De acordo com os dados do Ministério da Saúde, no período de 2012 a 2021 a cobertura vacinal de cães no Brasil foi inferior a 80% (meta definida pelo Programa Nacional de Controle da Raiva - PNCR) em todos os anos, exceto em 2018 quando houve cobertura de 82,2% (Ministério da Saúde, 2022). Associado a isso, observa-se também a menor vigilância, com diminuição dos laboratórios que realizam diagnóstico da raiva, evidenciando assim redução nos investimentos públicos no controle dessa enfermidade no Brasil nos últimos anos.

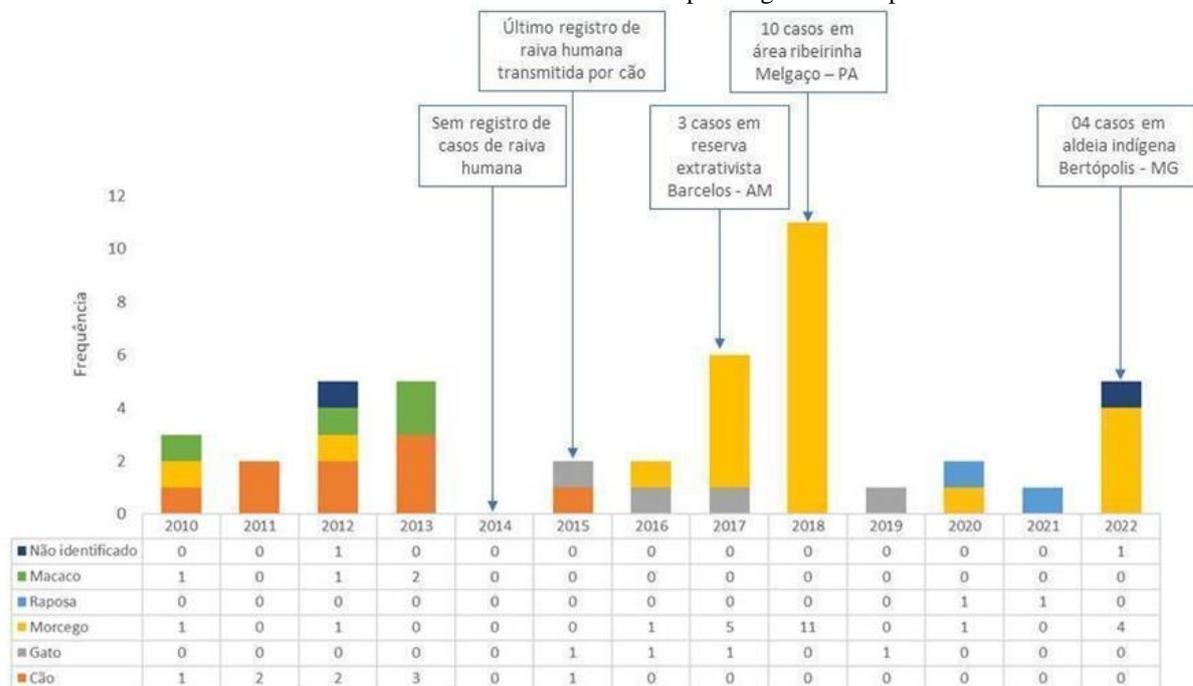
No período de 13 anos (2010 a 2022) foram descritos 45 casos de raiva humana, destes 24 (53,3%) foram desencadeados por morcegos, nove (20,0%) por cães e quatro (8,9%) por gatos. Os demais casos foram relacionados a agressão por primatas-não-humanos (quatro ocorrências), canídeos selvagens (dois casos) e dois casos com agente transmissor indeterminado (Gráfico 1).

Em 2015 houve o último caso registrado de raiva humana transmitida por cão em Mato Grosso do Sul, sendo este relacionado com a variante viral canina AgV1. No estado do Maranhão, os últimos casos relacionados com a variante viral canina AgV2 foram no ano de 2013.

Em alguns períodos foram observadas alta ocorrência da enfermidade em humanos na mesma região, todos relacionados a agressão ou espoliação por morcegos nos anos de 2017 (três casos em Barcelos-AM), 2018 (10 casos em Melgaço-PA) e 2022

(quatro casos em Bertópolis-MG) em regiões próximas a matas como áreas ribeirinhas, reservas extrativistas e aldeias indígenas (Ministério da Saúde, 2022) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Gráfico de casos de raiva humana de acordo com a espécie agressora no período de 2010 a 2022



Fonte: Ministério da Saúde (2022).

Mapa 1 - Gráfico de frequência de casos de raiva humana de acordo com a região do país no período de 2010 a 2022



Fonte: Ministério da Saúde (2022).

Houve detecção de 691 casos de raiva animal no Brasil em 2022 (dados atualizados em 23/11/2022 – preliminares, sujeitos a alterações), sendo a maior ocorrência entre quirópteros não hematófagos (160 casos – 23,1%) e bovinos (439 casos – 63,5%) (Quadro 1). Ao considerar o ciclo de transmissão, o ciclo doméstico (animais de produção) corresponde a 69% dos casos e o ciclo silvestre aéreo (quirópteros) equivale a 24% das ocorrências (Figura 1). Foram detectados seis casos de raiva canina, destes um por variante viral compatível com aquelas que circulam em canídeos silvestres, outro por variante compatível com aquelas que circulam em morcegos hematófagos (AgV3) e quatro ainda estão em análise. Dentre os oito casos de raiva felina detectados, quatro estavam relacionados a variante de morcego hematófago (AgV3), um com morcego insetívoro (AgV4) e três ainda estão em análise (Ministério da Saúde, 2022).

Em relação às regiões administrativas as maiores ocorrências foram no Sudeste (56%) e Nordeste com 387 (56%) e 150 casos (22%), respectivamente (Mapa 2). Dos

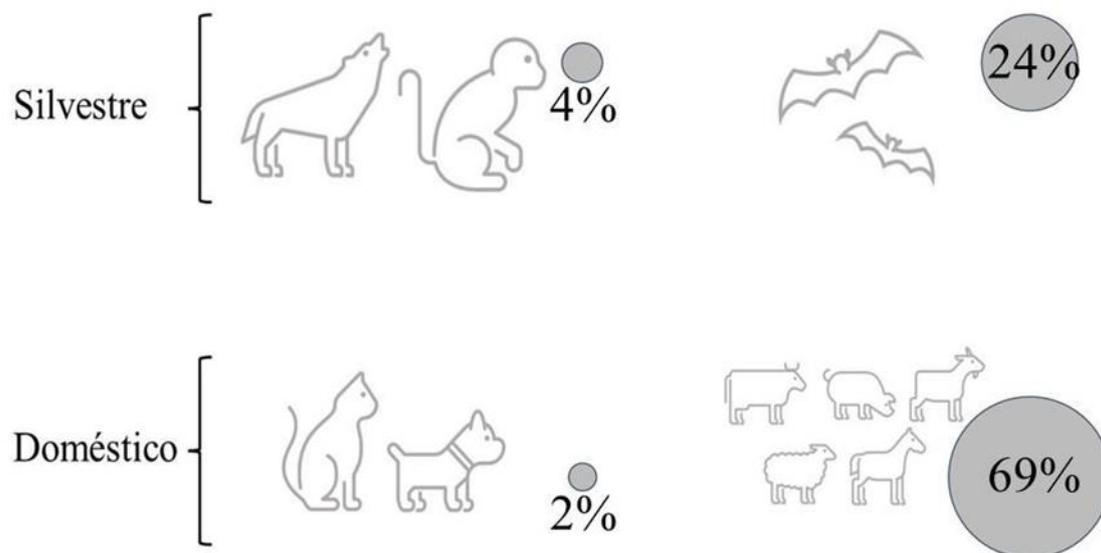
casos da região Sudeste, 291 (75%) foram detectados no estado de São Paulo (Ministério da Saúde, 2022).

Quadro 1 - Casos de raiva animal no Brasil de acordo com a espécie e região em 2022

Espécie animal/Região	Norte	Nordeste	Sudeste	Centro-oeste	Sul	Total
Canina	0	3	2	1	0	6
Felina	0	1	3	3	1	8
Bovina	6	69	234	69	61	439
Equina	3	2	19	9	0	33
Suína e herbívoros em geral	0	6	1	0	0	7
Quirópteros hematófagos	0	1	8	0	0	9
Quirópteros não hematófagos	0	39	120	1	0	160
Primata não humano	0	10	0	0	0	10
Canídeo silvestre	0	19	0	0	0	19
Total	9	150	387	83	62	691

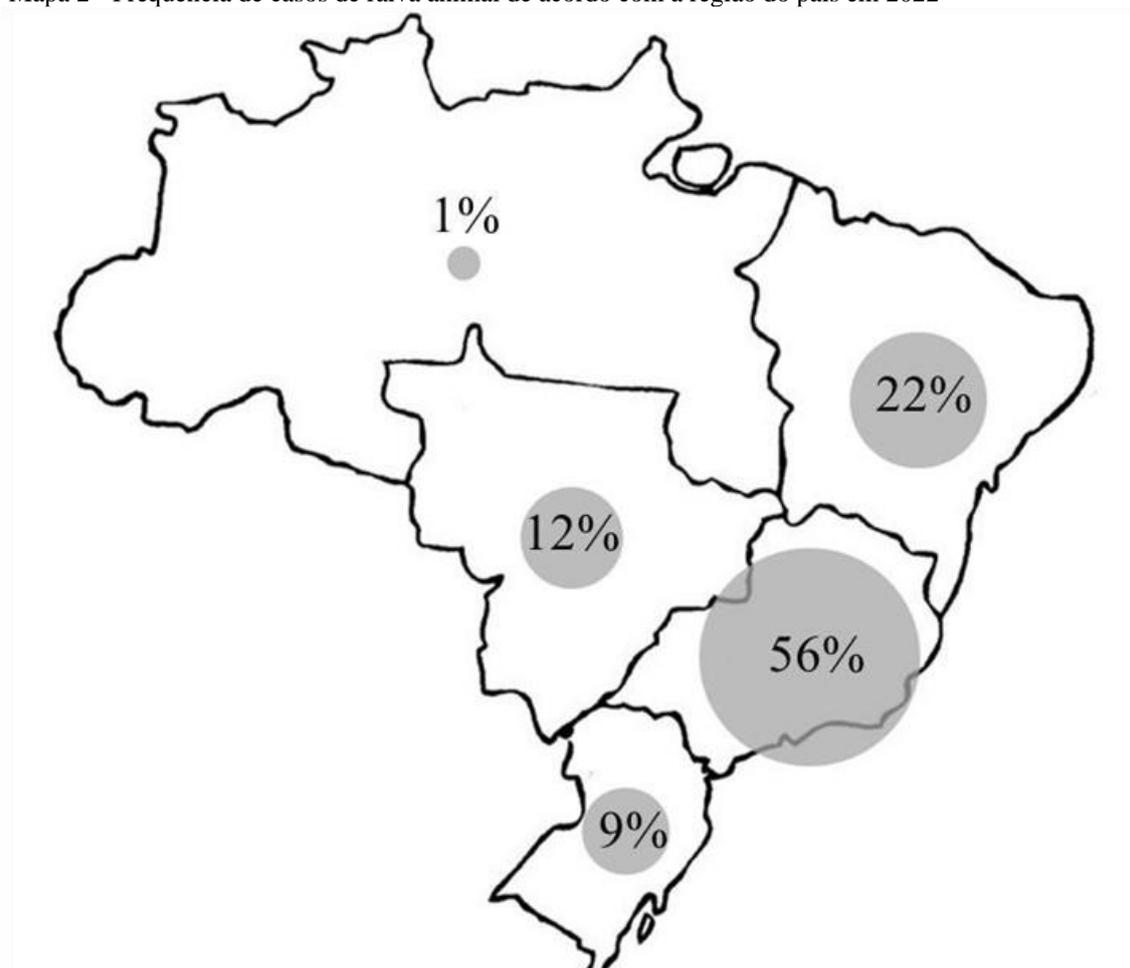
Fonte: Ministério da Saúde (2022).

Figura 1 - Ocorrência de casos de raiva animal em 2022, em destaque: 1) animais silvestres terrestres (primatas não humanos e canídeos); 2) quirópteros; 3) animais domésticos de companhia (cães e gatos); 4) animais domésticos de produção agropecuária (equídeos, bovinos, suínos, caprinos e ovinos)



Fonte: Ministério da Saúde (2022).

Mapa 2 - Frequência de casos de raiva animal de acordo com a região do país em 2022



Fonte: Ministério da Saúde (2022).

## 2.2. VACINAS

### 2.2.1. Tipos

Inicialmente a produção da vacina ocorria a partir do cérebro infectado de camundongos lactentes ou adultos, todavia em virtude dos diversos eventos adversos observados, atualmente é preferível a produção de vacinas a partir de cultura de células ou recombinantes (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDER, 2018).

Vacinas recombinantes têm sido desenvolvidas utilizando como vetores virais *racconpox* (*variola dos guaxinins*), *canarypox* (*variola dos canários*), entre outros, em que o gene RABV G é fragmentado e inserido no vetor viral, onde possuem capacidade de replicação limitada em células, nas quais serão multiplicados para produção da vacina (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDER, 2018).

Os tipos de vacinas antirrábicas (uso humano e animal) são:

- Vacina avianizada, tipo Flury: trata-se de uma vacina com o vírus vivo, com poucas passagens em embriões de galinha para aplicação em grandes e pequenos animais e no ser humano. O vírus, que deu origem à vacina, foi isolado por Leach e Johnson, de uma menina chamada Flury que morreu de raiva e posteriormente utilizado para a produção do imunógeno (SILVA; PASSOS, 1966). Em alguns casos a vacina causava eventos adversos relacionados a sinais clínicos da raiva, indicativo de reversão de virulência, caso ocorrido na década de 60 na região do Rio de Janeiro após a vacinação de 483 bovinos, observou-se o adoecimento de 52 bovinos, destes 39 morreram e 13 se recuperaram (SILVA; PASSOS, 1966). Dentre os sinais clínicos observados estavam a paralisia dos animais, opistótono, incoordenação motora e sialorreia. Houve isolamento do vírus vacinal quando testado em camundongos, coelhos e cobaias, inclusive com aparecimento de sinais clínicos compatíveis com raiva nestes animais (SILVA; PASSOS, 1966).

- Vacinas inativadas: são produzidas em células ou tecidos, tais como cérebro, tecido nervoso provenientes de ovelhas, cabras e camundongos. Foram produzidas há 100 anos atrás, e a partir de 2005 a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou que a produção fosse feita exclusivamente em cultura de células devido aos frequentes casos de eventos adversos, tais como reações de hipersensibilidade desenvolvidas com o uso das vacinas produzidas através de tecido nervoso de camundongos lactentes (denominada Fuenzalida-Palacios em humanos) (BONITO; DE OLIVEIRA; NISHIOKA, 2004). A multiplicação do vírus da raiva em cultura celular permitiu uma expansão da capacidade produtiva e representou um avanço em comparação à produção em tecidos nervosos (BESHAH, 2018). Os adjuvantes empregados comumente nestas vacinas de uso veterinário são hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio e saponina (YANG *et al.*, 2013).

- Vacinas vivas modificadas: devem possuir como características a indução de imunidade protetora, não patogênica, composta por vírus com alta capacidade de multiplicação e tolerância térmica (BESHAH, 2018). Inicialmente eram produzidas com a estirpe SAD BERNE e foram desenvolvidas especialmente para animais que atuam como reservatórios, tais como animais silvestres. Esta estirpe foi substituída pela *Street – Alabama – Gif* (SAG) 1 e SAG2. A vacina SAG2 é a única vacina oral registrada pela Agência Europeia de Medicamentos (do inglês *European Medicine Agency - EMA*). Outras vacinas regularizadas pela EMA são Lysvulpen, SAD-B19, SAD P5/88 (YANG

*et al.*, 2013). Embora haja uma baixa ocorrência é possível que a vacina cause raiva pela reversão da virulência viral. A estirpe Evelyn Rokitnicki-Abelseth (ERA) veio para substituir a vacina de Flury proveniente de passagem de ovos, pois esta causava muitos eventos adversos devido aos debris existentes provenientes dos ovos (LAWSON; CRAWLEY, 1972). A estirpe ERA demonstrou-se uma opção na composição de iscas para imunização de cães de rua no Egito (ALY *et al.*, 2022).

- Vacinas recombinantes: elaboradas com uma glicoproteína proveniente da estirpe ERA e inserida no *Vaccinia virus* (estirpe *Copenhagen*). É indicada para vacinação pela via oral para lobos e guaxinins, sendo ineficazes para gambás e cachorros (YANG *et al.*, 2013). As vacinas recombinantes feitas com o poxvirus possuem a vantagem de ser estável à temperatura ambiente (podendo ser ministradas em armadilhas na forma de sachês) e não haver risco da reversão da virulência, comum nas vacinas vivas atenuadas (MAKI *et al.*, 2017). Têm sido utilizadas com sucesso na América do Norte e na Europa no controle da raiva silvestre de acordo com o *United States Department of Agriculture* (USDA, 2020).

- Vacinas derivadas de plantas transgênicas tais como tomate, tabaco, milho, cenoura e espinafre com capacidade de expressão de proteínas antigênicas do vírus da raiva, tais como as glicoproteínas, com a vantagem de não haver o risco de contaminação com patógenos de origem animal e há estudos que demonstram a capacidade imunogênica destas quando aplicadas pela via subcutânea em camundongos (PARK *et al.*, 2021), todavia ainda estudos são necessários, pois pode haver variação da expressão das proteínas antigênicas entre as plantas (YANG *et al.*, 2013).

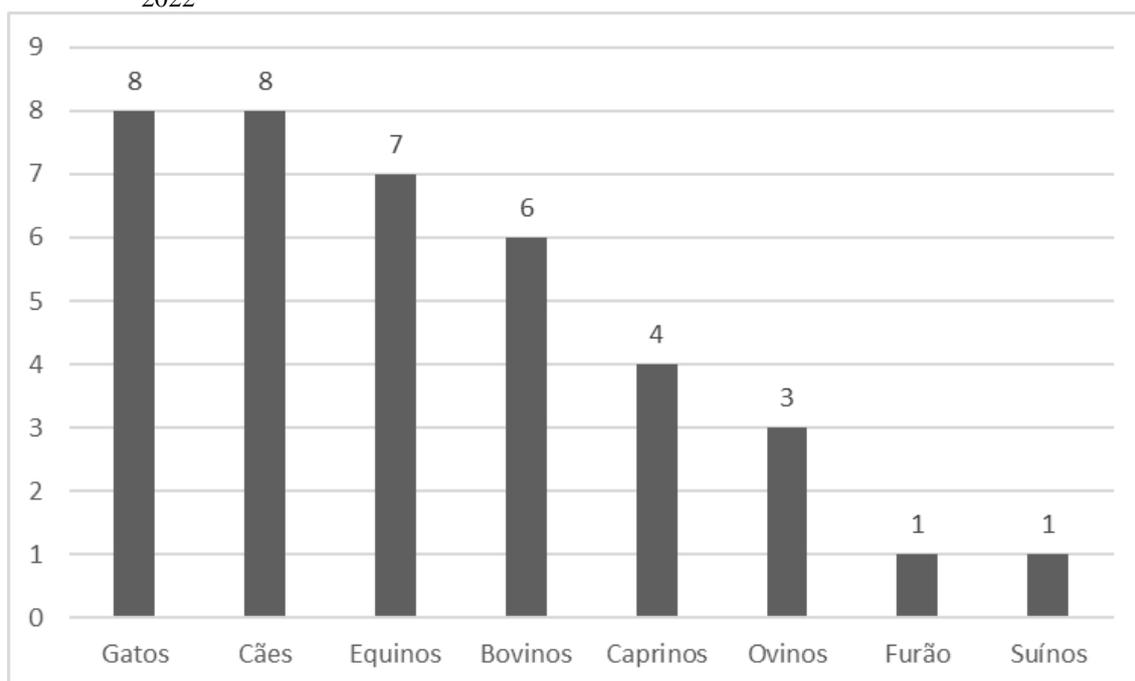
No Brasil, atualmente existem 14 vacinas antirrábicas inativadas de uso veterinário, registradas no MAPA (*Business Intelligence – MAPA*, novembro/2022) (Quadro 2). No Gráfico 2 constam as quantidades de vacinas inativadas aprovadas para uso por espécie no Brasil.

Quadro 2 - Vacinas antirrábicas de uso veterinário registradas no Brasil no ano de 2022, em relação a indicação de espécie e fabricante

Nome comercial	Espécie a que se destina	Fabricante
Bioraiva®	Bovinos, equinos	Biogénesis Bagó Saúde Animal LTDA
Bioraiva® PET	Cães, gatos	Biogénesis Bagó Saúde Animal LTDA
CANIGEN® R	Cães, gatos	Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA
HERTALIQ – Vacina inativada contra a raiva	Cães, gatos	Ceva Veterinária LTDA
Rabisin® /Imrab®	Cães, gatos, furão, equinos	Boehringer Ingelheim Animal Health do Brasil LTDA
Imunovet R	Cães, gatos	Laboratório Biovet LTDA (Vaxxinova)
Imunocan R	Cães, gatos	Grascon do Brasil LTDA
Ourovac® Raiva	Bovinos, caprinos, equinos, suínos	Ourofino Saúde Animal LTDA
Rai-Vac® I	Cães, gatos	Zoetis Indústria de Produtos Veterinários LTDA
Rai-vet líquida	Bovinos, equinos	Laboratório Biovet LTDA (Vaxxinova)
Bioraiva® Pet	Cães, gatos	Dechra Brasil Produtos Veterinários LTDA
Raiva i - Herbívoros	Bovinos, ovinos, caprinos, equinos	Lema-injex Indústria Cirúrgica LTDA
Raivacel Multi	Bovinos, ovinos, caprinos, equinos	Vallée S/A (MSD Saúde Animal LTDA)
Vacina contra a raiva Manguinhos	Bovinos, ovinos, caprinos, equinos	Produtos Veterinários Manguinhos LTDA

Fonte: *Business Intelligence* – MAPA (2022).

Gráfico 2 - Quantidade de vacinas antirrábicas de uso veterinário indicadas por espécie no Brasil no ano de 2022



Fonte: *Business Intelligence* – MAPA (2022).

### 2.2.2. Controle de Qualidade

Os medicamentos de origem biológica possuem a particularidade de apresentar uma variabilidade no processo produtivo, o que demanda que haja um controle de qualidade rigoroso das etapas de produção, além de estarem ligados a processos de cultivo e esterilização é de suma importância que as etapas sejam bem controladas de modo a evitar contaminação do produto (EUROPEAN COMMISSION, 2014).

Um produto farmacêutico deve ser seguro, eficaz, produzindo o efeito esperado e de qualidade, atingindo os parâmetros analíticos e de manufatura determinados para o mesmo (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 1997). A etapa de qualidade assegurada visa garantir que todos os parâmetros definidos anteriormente sejam atingidos, através de boas práticas de fabricação (BPF), laboratoriais (BPL) e clínicas (do inglês *Good Clinical Practice* - GCP) definidos por órgãos internacionais.

As boas práticas de fabricação garantem que os produtos produzidos o são de maneira consistente e controlada com o intuito de atingir parâmetros previamente estabelecidos. Entre as boas práticas de fabricação está a validação do processo, que consiste em avaliar se o processo, os equipamentos utilizados no mesmo e insumos estão de acordo com os parâmetros previamente definidos e que os produtos finais se apresentam adequados e dentro dos parâmetros aceitáveis para a comercialização (FAO, 1997).

As boas práticas de fabricação determinam o atendimento a itens como: treinamento da equipe, documentação das atividades, controle de qualidade do processo, tratativa das não-conformidades como reclamação dos clientes e *recall* e auditorias internas (FAO, 1997).

Em relação ao treinamento da equipe é de suma importância que os envolvidos compreendam o processo produtivo e sejam adequadamente treinados para trabalhar na área, além disso, devem estar cientes da importância do uso de equipamentos de proteção individual (EPI's) que previnam a contaminação de si mesmo, a disseminação de microrganismos para o exterior da área produtiva ou ainda a contaminação cruzada entre os produtos produzidos. Quando aplicável, os colaboradores envolvidos devem ser imunizados contra as enfermidades a que podem estar submetidos, por exemplo, no processo produtivo e de análise de controle de qualidade de vacinas antirrábicas é recomendável que os colaboradores sejam vacinados contra a raiva (FAO, 1997).

A equipe deve ser treinada constantemente, principalmente porque na planta fabril, durante o processo produtivo há possibilidade de disseminação do agente biológico tanto para a área exterior da planta quanto para outros produtos que serão produzidos (EUROPEAN COMMISSION, 2014).

A planta onde ocorre o processo produtivo possui algumas particularidades que visam evitar a disseminação ou contaminação do produto final, assim há um fluxo de ar controlado com gradiente de diferencial de pressão monitorado e controlado, antecâmaras para controle da entrada e saída de materiais e eventualmente há a instalação de autoclaves dupla porta para esterilização dos materiais que entram ou saem da instalação (EUROPEAN COMMISSION, 2014).

Além disso, após a comercialização, a farmacovigilância possui o papel de avaliar como o produto está sendo utilizado pelo consumidor final, esta etapa permite o rastreamento de eventos adversos que não puderam ser detectados na etapa de pesquisa clínica, o que pode ocorrer em virtude de ser um evento adverso pouco frequente ou por se manifestar após interações medicamentosas ou por estar relacionado a um grupo específico, que pode não ter sido contemplado na etapa de pesquisa clínica (FAO, 1997).

A vacina antirrábica é preparada a partir de uma semente (*master seed*), que trata-se de uma produção viral estocada e que deve ser pura, imunogênica e segura de acordo com o *Code of Federal Regulations* (CFR, 2022).

A avaliação de segurança de uma vacina compreende tanto a vacinação da espécie-alvo quanto em animais de laboratório (camundongos e cobaias) (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDER, 2018).

Além disso, fazem parte do controle de qualidade testes de titulação anteriores à inativação do vírus vacinal, além dos testes de potência NIH tanto nas amostras após a inativação, mas que ainda são de etapas anteriores à produção da vacina, quanto da vacina acabada. Ainda, são realizados testes de potência NIH periodicamente durante o período de validade da vacina, a fim de verificar a eficácia da mesma durante todo o *shelf life* (CFR, 2022).

Ao término da produção da vacina, cada partida deve ser testada e livre de *Mycoplasma spp*, fungos e bactérias (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDER, 2018).

### 2.2.3. Resultados fora da especificação

Para cada amostra gerada no processo produtivo, seja do produto acabado ou intermediário, há parâmetros pré-definidos e esperados para cada análise. Uma vez que o resultado esperado não seja alcançado, este é denominado fora da especificação (do inglês *out of specification* - OOS), o que demandará uma profunda investigação das possíveis causas do desvio e que pode ser decorrente do método de análise ou do próprio processo produtivo (KUMAR; VISHAL GUPTA, 2015).

De acordo com o guia do *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA “*Investigating out-of-specification (OOS) test results for pharmaceutical production guidance for industry*”, o processo investigativo pode ser dividido em fase I - investigação laboratorial e fase II - investigação em larga escala.

Na fase I a investigação percorre desde os insumos utilizados no processo quanto a qualidade e validade, treinamento da equipe e resultados laboratoriais obtidos. Incluindo uma análise dos dados originais, cálculos realizados, funcionamento dos equipamentos e avaliação geral do processo (KUMAR; VISHAL GUPTA, 2015). Caso seja encontrada alguma inconsistência que permita a conclusão de que houve falha no processo, então conclui-se que aquela amostra produzida é inválida e deve-se avaliar as tratativas necessárias para a mesma. Caso apesar da investigação realizada na fase I, ainda não tenha sido possível determinar a causa do resultado fora da especificação, então o recomendável é seguir para uma avaliação de fase II que deve ser feita em larga escala envolvendo a verificação de todo o processo de produção, incluindo todos os departamentos envolvidos e uma análise crítica da necessidade de uma nova amostragem para realização de um novo teste ou mesmo a repetição do teste com a mesma amostra (FDA, 2022).

A re-amostragem e consequente reteste devem ser realizados quando há suspeita de coleta inadequada da amostra (KUMAR; VISHAL GUPTA, 2015).

As medidas corretivas serão tomadas de acordo com as conclusões obtidas nas análises da OOS, nos casos em que se atribuiu a falha ao produto testado, ou seja, o produto não atendeu aos critérios de aceitação, então deve-se avaliar o destino correto da amostra, o que muitas vezes culmina com o descarte do lote de amostras testado. Além disso, nestes casos deve-se estender o processo investigativo para outros lotes produzidos ou produtos que podem estar associados a falha observada (FDA, 2022).

Quando a investigação permite concluir que houve falha na análise do produto por causas inerentes à técnica utilizada, então esta falha deve ser tratada e o resultado obtido não pode ser utilizado para avaliar o produto (FDA, 2022).

Quando ao término do processo investigativo da OOS não foi possível determinar a causa raiz, deve-se avaliar o histórico do teste e da amostra como um todo, a fim de verificar se trata-se de um caso pontual ou que necessita de uma investigação mais ampla. Algumas vezes os resultados obtidos dentro do intervalo especificado, porém com uma redução dos valores ao longo do tempo podem ser um indicativo de atenção, por isso é importante o monitoramento e acompanhamento dos resultados a cada teste, de modo a mitigar falhas e agir prontamente diante das falhas verificadas (FDA, 2022).

#### **2.2.4. Processo produtivo**

As boas práticas de fabricação e o controle de qualidade são importantes para o processo produtivo de vacinas, visto que os componentes ativos são produzidos pela própria indústria farmacêutica e estes são biológicos, passíveis de contaminação e também de alteração a cada lote produzido (FAO, 1997).

As vacinas produzidas apenas são liberadas para comercialização mediante a comprovação, através de testes em animais de laboratório, da segurança, pureza, potência e eficácia (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDER, 2018).

No Brasil, os laboratórios fabricantes das vacinas de raiva enviam os frascos de vacina das partidas aprovadas para a AGV LOGÍSTICA SA (Armazéns Gerais Vinhedo LTDA) que presta o serviço de selagem, armazenagem e entrega da vacina para os pontos comerciais. As atividades são concentradas neste centro de modo a promover a rastreabilidade, o que faz parte do Programa Nacional de Controle de Raiva dos Herbívoros (PNCRH), que determinou o uso de um selo holográfico em todos os frascos de vacinas contra a raiva dos herbívoros em partidas aprovadas e liberadas para a comercialização pelo Ministério da Agricultura. Esse processo permite a melhoria da rastreabilidade, fornece dados de comercialização e facilita a estocagem e distribuição das vacinas em todo o Brasil.

Embora ainda não haja uma completa harmonização entre os órgãos regulatórios quanto à aprovação de vacinas antirrábicas de uso veterinário, os órgãos dos países mais exigentes tais como EUA, Canadá, União Europeia, Austrália, Nova Zelândia e Japão

apresentam critérios de aprovação semelhantes (RUPPRECHT, C.E.; FOOKS, A.R.; ABELA-RIDER, 2018).

### 2.2.5. Testes de controle de qualidade

A produção de vacinas antirrábicas é realizada pela indústria farmacêutica veterinária e deve atender às exigências da Portaria n° 228/1988 do Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA, 1988) quanto a capacidade de conduzir os testes que envolvem o controle de qualidade de vacinas. No Brasil é permitida a produção de vacinas antirrábicas contendo o vírus inativado e modificado. Para esse tipo de vacina são necessários os testes:

- Esterilidade: pesquisa bacteriológica e fúngica nas amostras de vacina.
- Vírus residual: avaliação da inativação do vírus utilizado para compor a vacina através da inoculação da vacina em camundongos lactentes e jovens.
- Inocuidade: teste realizado através da inoculação de camundongos e cobaias com amostras da vacina para verificação de alguma alteração da inocuidade através de reação no local de aplicação ou de maneira sistêmica.
- Eficiência: através do método NIH é realizada a comparação da vacina produzida com uma vacina padrão de referência.
- Controle de pH
- Controle de vácuo: o vácuo total deve existir durante o envase de vacinas liofilizadas
- Controle do tempo de reconstituição: aplicável para vacinas liofilizadas, neste caso o tempo de reconstituição não deve ultrapassar 60 segundos.
- Umidade: a umidade de vacinas liofilizadas deve ser inferior a 3%
- Validade: as vacinas devem ser conservadas entre 2 e 8°C e ser avaliadas quanto à durabilidade nestas condições. Por padrão as vacinas líquidas devem ser testadas para a validade de até 12 meses e as liofilizadas para até 24 meses.
- Imunidade

De acordo com a Portaria n° 228/1988 do MAPA (MAPA, 1988) o estabelecimento produtor de vacinas antirrábicas deve possuir condições de realizar os próprios testes de controle de qualidade que envolvam o uso de animais. Assim deve possuir animais disponíveis no biotério de criação e para uso no biotério de

experimentação. Deve possuir um responsável técnico que seja médico veterinário com conhecimento para se responsabilizar pelos testes de controle de qualidade.

Devido à complexidade das instalações, na aquisição e manutenção dos animais, - visando manutenção do controle de qualidade dos testes vacinais - a legislação permite que a indústria contrate os serviços de outra empresa para a realização dos testes em animais.

A espécie animal a ser utilizada no teste é definida por legislações brasileiras e, na ausência delas, o MAPA indica qual legislação internacional deve ser utilizada. Predominantemente são utilizados para estes testes em vacinas, as seguintes espécies de animais de laboratório: camundongos da linhagem *Swiss-Webster* (*Mus musculus*), cobaios (*Cavia porcellus*), coelhos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) e hamster sírio (*Mesocricetus auratus*).

#### **2.2.6. Fatores que interferem nos testes de controle de qualidade**

A maneira como os animais de laboratório se comportarão durante o teste de controle de qualidade está intrinsecamente relacionada às condições sanitárias, genéticas e aos fatores ambientais a que são expostos (MAJEROWICZ, 2008).

O ambiente deve proporcionar condições favoráveis para o desenvolvimento do animal com bem-estar e de forma padronizada e adequada para a espécie, com a intenção de reduzir possíveis variáveis que possam interferir no desenvolvimento dos testes (MAJEROWICZ, 2008).

Dentre os vários fatores que podem interferir nos testes de controle de qualidade estão destacados os intrínsecos ao animal (peso, idade, status sanitário, linhagem), relacionados ao microambiente (cama, odor, densidade populacional, água e ração) e macroambiente (temperatura, umidade, iluminação, ventilação, filtração de ar e ruído) (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

##### **2.2.6.1. Peso e idade dos animais**

O peso, idade e linhagem do camundongo são capazes de causar variações nos resultados. Wunderli *et al.* (2003) realizou o teste de NIH com camundongos com 4 semanas de idade e com seis semanas de idade no momento da primeira vacinação e verificou que essa diferença foi significativa para os resultados. Os animais mais jovens

(com 4 semanas de idade) apresentaram taxa de mortalidade superior aos animais mais velhos (com 6 semanas de idade). Também se observou que animais mais velhos (6 semanas de idade) apresentavam resultados mais reprodutíveis do que animais mais novos (4 semanas de idade), provavelmente por causa da capacidade de resposta imune.

Atualmente, para os testes de Controle de Qualidade de vacinas antirrábicas, o critério de seleção dos animais é baseado no peso dos mesmos, para a maioria dos testes entre 11 e 14 g, mas é recomendável que a seleção seja de acordo com a idade, ou seja 4 semanas de idade devido justamente à variação de peso dos animais com a mesma idade (WUNDERLI *et al.*, 2003).

#### 2.2.6.2. Hierarquia

Os camundongos são animais sociais, preferindo viver em grupos harmoniosos e estáveis, por isso é importante ser criterioso ao reorganizar os grupos de animais de modo a evitar o desequilíbrio da sociedade formada. Além disso, decorre a importância da aclimação dos animais, para que haja tempo para se formar a sociedade e evitar rompê-la (FAWCETT, 2012). Embora os casos de agressividade sejam menores quando os animais da mesma ninhada são mantidos juntos (FAWCETT, 2012) é importante que os grupos experimentais sejam compostos pelos animais da ninhada distribuídos nos diferentes grupos, para assim evitar um viés (PERRIN, 2014). Por isso a importância do período de aclimação, a fim de que os animais de diferentes ninhadas se adaptem e estabeleçam a hierarquia previamente ao início dos testes.

#### 2.2.6.3. Sexo

Há variações de agressividade de acordo com o sexo utilizado, sendo os machos mais agressivos do que as fêmeas e as brigas desencadeiam o estresse, o que pode influenciar nos resultados dos testes clínicos (THEIL *et al.*, 2020). Além disso, é importante que sejam utilizados tanto machos quanto fêmeas nos testes, para que os resultados dos testes sejam representativos (PERRIN, 2014) e, embora no passado houvesse a crença de que o uso de fêmeas nos estudos clínicos pudesse representar maior variabilidade nos resultados, atualmente sabe-se que isto não ocorre (BEERY, 2018).

#### 2.2.6.4. *Status* sanitário

Nos testes de controle de qualidade de vacinas, devem ser utilizados animais provenientes de uma criação controlada, com requisitos básicos de higiene e biossegurança, em ambiente com as condições ideais para a espécie animal e com o *status* sanitário conhecido através de monitoramentos periódicos da sanidade da colônia (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Em geral os animais utilizados são obtidos de: a) criações convencionais: quando a microbiota é indefinida e os animais são criados em condições básicas de higiene, porém sem barreiras sanitárias rigorosas (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002); b) criações convencionais controladas: há critérios de biossegurança e há monitoramento da microbiota periodicamente, sendo livre da maioria dos microrganismos patogênicos (MAJEROWICZ, 2005) ou c) criações de animais livres de patógenos específicos (do inglês *Specific Pathogen Free - SPF*): quando os animais são criados em condições sanitárias rigorosas e acompanhados periodicamente quanto aos microrganismos da microbiota, sendo livres de determinados microrganismos (MAJEROWICZ, 2005), sendo este tipo de criação aplicável apenas para camundongos.

Um *status* sanitário conhecido, permite que haja uma padronização dos animais utilizados no controle de qualidade de vacinas, como uma das ferramentas para redução da variabilidade dos testes. Todavia, a alta demanda de animais para estes testes muitas vezes inviabiliza financeiramente o uso de animais SPF. É muito importante que se defina o padrão sanitário que será utilizado no biotério, pois à medida que o padrão se torna mais restrito proporcionalmente o custo operacional é elevado (SILVA, 2013).

A observação periódica dos animais é importante para a ação precoce mediante suspeita de enfermidades, uma vez que os camundongos possuem muitas enfermidades subclínicas, é importante que além da observação clínica, a colônia também seja monitorada através de exames laboratoriais (BURKHOLDER *et al.*, 2012).

#### 2.2.6.5. Transporte

O transporte de animais, seja a longas distâncias ou não, pode causar distúrbios comportamentais, o que pode ser variável de acordo com a linhagem de camundongos, o método de transporte, a distância percorrida, entre outros. Por isso é recomendável que os animais passem por um período de aclimação, para que sejam reduzidas as possíveis

alterações causadas pelo transporte. O período de aclimação pode ser de um a sete dias, de acordo com o objetivo do estudo e com a linhagem utilizada (FAWCETT, 2012).

#### 2.2.6.6. Vírus desafio

Para realização do teste de potência NIH é utilizado o vírus fixo da raiva (*Challenge Virus Standard - CVS*) inoculado pela via intracerebral de modo a verificar a capacidade protetora da vacina em teste. Trata-se de um vírus padrão que deve ser adquirido de um Instituto de Referência Internacional, como o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS-Fiocruz). O vírus é fornecido liofilizado e deverá ser multiplicado para originar a semente de trabalho que será estocada e utilizada para as inoculações experimentais durante os testes de potência NIH. Não há uma validade pré-determinada para o uso do vírus após o preparo e estocagem, porém deve-se acompanhar os resultados dos testes de titulação ao longo do tempo, durante o uso e quando for observado o decréscimo significativo do título viral deve-se atentar para a necessidade de produção de um novo lote viral. O vírus da raiva por ser envelopado é sensível a variações de temperatura e variações de condições de armazenamento e o decréscimo da infectividade viral é acelerada em temperaturas de armazenamento mais altas quando comparadas com temperaturas ultrabaixas (COSTA *et al.*, 2011).

Em estudo de Costa *et al.* (2011) verificou-se que um crioprotetor adequado para o vírus da raiva é a sacarose na concentração de 10% ou 68% a curto prazo. Dessa forma, a adição deste crioprotetor auxilia no prolongamento da vida útil do vírus e possibilita a apresentação de resultados de titulação menos variáveis, visto que as partículas virais se apresentam conservadas.

#### 2.2.6.7. Meio Ambiente

Há vários fatores que influenciam a qualidade do microambiente em que o camundongo está, entre eles os ruídos, vibrações, luminosidade, temperatura e umidade.

Dado que estes animais possuem uma alta sensibilidade a sons, inclusive com capacidade de audição de sons ultrassônicos, o ideal é que sejam mantidos distantes de sirenes, equipamentos e demais atividades que produzam ruídos e o mesmo é válido para as vibrações (CONCEA, 2019).

A luminosidade deve ser uniforme e controlada por temporizadores de modo a garantir uma regularidade no período de claro e escuro (CONCEA, 2019).

A temperatura de bulbo seco no macroambiente ideal está entre 20°C e 26°C com variabilidade máxima de 4°C (CONCEA, 2019). Em trabalho de Bell e Moore (1974) foi verificado que a manutenção dos camundongos infectados a 35°C por 28 dias após a infecção com o vírus da raiva, fez com que houvesse apenas 25% de mortalidade quando comparado ao grupo mantido a temperaturas entre 20 e 22°C em que houve 75% de mortalidade, o que seria em decorrência da alta temperatura ambiente influenciando a virulência do vírus da raiva. As altas temperaturas, em torno de 29 a 33°C, podem provocar a redução da ingestão de alimentos (FAWCETT, 2012).

O ideal é que os animais passem por aclimação antes de entrar em estudo, quando há o transporte dentro do próprio local recomenda-se uma aclimação de 24 horas, quando os animais são adquiridos de um ambiente externo recomenda-se 3 a 7 dias de aclimação, o que é impraticável para camundongos dos testes de NIH, pois geralmente eles são recém desmamados e já são incluídos no teste (FAWCETT, 2012).

Quanto a umidade relativa no macroambiente, o recomendável é que seja entre 40 e 60% (CONCEA, 2019).

A circulação de ar no ambiente deve ser controlada, a fim de garantir as trocas de ar necessárias para manutenção da qualidade do ar, sendo recomendável entre 15 e 25 trocas de ar por hora no macroambiente (CONCEA, 2019).

De acordo com as recentes recomendações do CONCEA, os parâmetros de ventilação, exaustão, temperatura e umidade devem ser controlados (CONCEA, 2022b).

#### 2.2.6.8. Densidade populacional

A densidade populacional influencia diretamente nos parâmetros de ganho de peso e imunológicos (FAWCETT, 2012).

De acordo com guias do CONCEA, os camundongos alojados em grupos precisam de uma gaiola com altura mínima de 12,7 cm e área/animal variável de acordo com o peso de 38,7 a 96,7 cm<sup>2</sup>, devendo-se considerar também o sexo e grupamentos já formados (CONCEA, 2019).

A gaiola deve ter uma altura adequada em que o animal consiga ficar em pé. O acesso a ração e a água deve ser feito em pé, mas que possibilite que o animal sente enquanto come e bebe. A tampa da caixa deve favorecer a escalada (FAWCETT, 2012).

#### 2.2.6.9. Cama e enriquecimento ambiental

Para forração a cama deve ser confortável e possibilitar o manuseio pelo animal, para que ele cave a cama, por isso é recomendável que ela tenha cerca de dois centímetros de altura. É importante que a partícula não seja muito fina para que não haja distúrbios respiratórios e irritação da mucosa dos animais (FAWCETT, 2012). Ela deve ser de material absorvente, macia, atóxica e preferencialmente, estéril (CONCEA, 2019). É importante se atentar para a origem do material utilizado, como no Brasil, a maior parte dos biotérios utiliza forração proveniente de madeira (como a maravalha de pinus), esta não deve ser composta de madeira tratada, pois há riscos de intoxicação e danos hepáticos (FAWCETT, 2012).

O enriquecimento ambiental é recomendável e o não uso deve ser justificado de acordo com a Resolução nº 57 de 6 de dezembro de 2022 (CONCEA, 2022b), pois proporciona a redução do estresse e brigas, mesmo entre machos (FAWCETT, 2012) e as alternativas são desde o fornecimento de material para preparo de ninho até petiscos, devendo-se sempre considerar os hábitos e a biologia da espécie. Ainda, os materiais utilizados devem ser de fácil higienização, para que não contamine o ambiente (CONCEA, 2019).

Em estudo realizado por Cait *et al.*, 2022 verificaram que o alojamento em gaiolas convencionais, sem nenhum tipo de enriquecimento, eleva os níveis de estresse e podem exacerbar os sinais clínicos de enfermidades. O enriquecimento ambiental permite que o animal se exercite, explore novas atividades como construir ninhos e fazer tocas e proteção térmica (CAIT *et al.*, 2022).

#### 2.2.6.10. Luminosidade

A luminosidade é importante no aspecto da intensidade (lux) e duração (fotoperíodo) e uniformidade. Para camundongos a luminosidade deve ser de até 25 lux (FAWCETT, 2012; CONCEA, 2019), mas em geral a recomendação é de 325 lux 1m acima do piso (CONCEA, 2019), enquanto que nas áreas de trabalho é aceitável o uso de 210 lux (FAWCETT, 2012). O ideal é uma transição gradual entre luz e escuro e é aceitável um fotoperíodo de 12h/12h (FAWCETT, 2012).

#### 2.2.6.11. Limpeza

A trocas das camas devem ser feitas conforme necessidade, quando se observar saturação do material de forração e de acordo com o odor de amônia, o recomendável é que não seja superior a 25 partes por milhão (ppm) (FAWCETT, 2012).

Quando houver a troca de cama, preferencialmente transferir o material usado para fazer ninhos juntamente para a cama nova. Esse procedimento evita estresse (FAWCETT, 2012).

#### 2.2.6.12. Mão de obra

A mão de obra não treinada adequadamente poderá ter dificuldades em reconhecer os sinais clínicos dos animais doentes em decorrência do desafio, principalmente no estágio inicial da doença. É fundamental que o acompanhamento dos animais após o desafio seja frequente, se possível uma a duas vezes ao dia, pois isso possibilitará o acompanhamento da progressão da doença e, principalmente do interrompimento da participação do animal no teste quando houver um estágio clínico incompatível com a vida, ou seja, quando for necessária a definição do *endpoint* humanitário (ARAUJO; PAIXÃO, 2019).

O colaborador que manipula os animais deve evitar ter contato com animais predadores de camundongos antes de manipulá-los, tais como gatos e ratos (FAWCETT, 2012).

A manipulação do camundongo, seja manualmente ou com auxílio de outros instrumentos é capaz de afetar a resposta imune, o que pode ser variável de acordo com a linhagem de camundongo testada (FAWCETT, 2012). Verificou-se que camundongos manipulados diariamente durante duas semanas apresentaram redução da resposta por IgG (FAWCETT, 2012).

#### 2.2.6.13. Inoculação intraperitoneal

A inoculação intraperitoneal é a via de aplicação utilizada para a vacinação e revacinação dos animais nos testes de NIH. Essa via apresenta 10 a 20% de falha (DAS; NORTH, 2007) devido a extravasamento de conteúdo aplicado ou local incorreto de deposição do conteúdo.

## 2.3. NIH

### 2.3.1. Técnica

O teste de potência NIH trata-se de um teste para a avaliação da eficácia de uma vacina antirrábica inativada de uso veterinário (animais domésticos ou de produção), sendo um dos testes obrigatórios para a comercialização da vacina no país (Portaria nº228/1988 - MAPA). É baseado na comparação dos resultados de Dose efetiva 50% da vacina teste e da vacina referência após o desafio dos animais vacinados com uma concentração pré-determinada do vírus fixo da raiva (CVS - *Challenge virus standard*) por inoculação intracerebral.

Resumidamente, 168 camundongos recém-desmamados com peso de 11 a 14 g são divididos em oito grupos de 16 animais vacinados e quatro grupos de animais não vacinados (testemunho). A vacina teste e a vacina de referência são administradas em 4 diluições diferentes (1:5, 1:25, 1:125, 1:625) em cada grupo no D0 e D+7, portanto duas doses de 0,5 mL em cada animal pela via intraperitoneal. No D+14 todos os animais são inoculados pela via intracerebral com vírus CVS no volume de 0,03 mL/animal com uma diluição de desafio, que seja capaz de causar a mortalidade de 100% dos animais não vacinados (testemunho). Os animais serão observados por 14 dias após a inoculação (D+14 ao D+28), sendo avaliados apenas os animais que apresentarem sinais clínicos ou mortalidade após o quarto dia da inoculação intracerebral. Os sinais clínicos são avaliados individualmente de acordo com estágios definidos por Bruckner *et al.*, 2003:

- Estágio 1: O animal apresenta-se com o dorso curvado e com os pelos eriçados. Nessa fase inicial, ainda não é possível caracterizar como raiva, uma vez que esses sinais clínicos não são patognomônicos.
- Estágio 2: Os primeiros sinais de distúrbio neurológico aparecem, em que o animal se move mais lentamente e eventualmente pode apresentar movimentos circulares.
- Estágio 3: Os sinais neurológicos se agravam e há tremores e, eventualmente, convulsões. Além disso, há perda de peso significativa. Como os sinais tendem a progredir e já há evidências de que seja raiva, nesse estágio deve-se considerar o *endpoint* humanitário.

- Estágio 4: Claudicação e paresia, principalmente dos membros posteriores que evoluem rapidamente para paralisia completa e, nesta fase o animal apresenta desidratação severa.
- Estágio 5: Os animais estão moribundos, desidratados e não se alimentam. O ideal é que o animal seja submetido à eutanásia antes de atingir esse estágio.

No D+28 o teste será concluído e serão contabilizados os números de animais vivos e saudáveis e animais que estão com sinais clínicos compatíveis com raiva ou que morreram em decorrência da raiva. Estes dados serão incluídos em softwares específicos que fazem a análise de Probit, onde serão calculados a  $DE_{50\%}$  e a potência relativa.

O teste será considerado válido quando:

- O título do vírus CVS inoculado nos animais do grupo testemunho for  $\geq 10,00$   $DL_{50}/0,03mL$ ;
- A vacina de referência apresentar  $DE_{50\%}$  entre 7,11 mL e 216,29 mL;
- Não houver desvios significativos nos testes de linearidade e paralelismo;
- Os limites fiduciais de erro ( $p = 0,95$ ) não devem ser inferiores a 25% e não superiores a 400% da potência relativa.

Quando o teste é válido, então a vacina é avaliada e considerada aprovada quando a potência relativa  $\geq 1,00$  UI/dose.

Os animais sobreviventes são submetidos à eutanásia e as carcaças descartadas.

### **2.3.2. História**

O primeiro teste que surgiu para avaliação da potência de vacinas antirrábicas foi o teste de Habel em 1940 (SERVAT; CLIQUET, 2015), o qual utilizava 90 camundongos para cada vacina avaliada, sendo que 60 animais recebiam a vacina teste pela via intraperitoneal em seis momentos: D0, D+2, D+4, D+7, D+9 e D+11. No D+14 estes animais eram subdivididos em cinco grupos, de acordo com a concentração do vírus desafio inoculada pela via intracerebral. Além destes, 30 animais denominados controle (não vacinados) eram divididos em três grupos, em que cada um recebia uma concentração do vírus desafio pela via intracerebral e os sinais clínicos eram observados até o D+28, quando os sinais clínicos e mortalidade entre grupos vacinado e controle eram comparados e determinada a potência da vacina (KAPLAN; MARTIN; KOPROWSKI, 1976).

Para as vacinas formidogel, produzidas em tecido nervoso e inativada com formol, era realizado o teste de potência em cobaias, em que eram utilizados 20 animais por teste, sendo 10 do grupo teste, que recebiam a vacina pela via subcutânea nos momentos D0 e D+7. No D+14 todos os animais eram desafiados pela via intramuscular e observados até o D+28 (desafio realizado com o vírus fixo da raiva) ou D+35 (desafio realizado com o vírus de rua) (MAPA, 1988; KAPLAN; MARTIN; KOPROWSKI, 1976).

Em substituição ao teste de Habel, o teste de NIH foi desenvolvido em 1953 pelo *National Institutes of Health* (NIH) dos EUA (Bethesda, MD, EUA), que deu nome a prova (SCHIFFELERS *et al.*, 2014). Este ensaio é utilizado para controle de qualidade de vacinas antirrábicas humanas e veterinárias. Devido ao longo tempo de uso (quase 70 anos) e pela utilidade do mesmo, é considerado um teste padrão-ouro para a avaliação da potência de vacinas antirrábicas (SCHIFFELERS *et al.*, 2014). Estima-se que sejam utilizados 50.000 a 70.000 camundongos por ano na União Europeia e nos EUA para os testes de NIH (BRUCKNER *et al.*, 2003). A prova de NIH nunca foi propriamente validada e os resultados intra e interlaboratoriais apresentam alta variabilidade, podendo chegar a 400% entre diferentes testes (BRUCKNER *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2018), sendo um teste criticado com várias ressalvas e com recomendações de mudança desde 1988 (BARTH; DIDERRICH; WEINMANN, 1988). A Autoridade Nacional de Medicamentos e Produtos de Saúde da França (do francês *Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé* – ANSM) fez um levantamento retrospectivo de dois anos para testes de vacinas antirrábicas de uso humano e verificou que apenas 42% dos testes de NIH realizados atendiam a todos os critérios de validação definidos pela Farmacopeia Europeia (do inglês *European Pharmacopoeia*), indicando que a prova necessita ser frequentemente repetida (SERVAT *et al.*, 2008).

A prova de potência NIH possui várias desvantagens, entre elas, destaca-se: o prazo de 28 dias para se ter um resultado, que geralmente tem alta variabilidade, podendo não haver resultado ao término do teste, existindo a possibilidade de ocorrência de retestes, em virtude dos critérios de validação. Trata-se de um teste oneroso, que representa risco à saúde humana, pois os animais inoculados com vírus fixo adoecem com a raiva e há riscos de exposição ao operador. Além disso, os resultados do teste podem apresentar alta variabilidade, de acordo com a habilidade do operador ou da subjetividade da avaliação do teste (relacionados com treinamento insuficiente e falta de experiência), além de ser dependente de uma vacina referência (RUPPRECHT; FOOKS; ABELARIDER, 2018; SERVAT; CLIQUET, 2015).

## 2.4. 3RS NOS TESTES DE VACINAS

Embora algumas metodologias de controle de qualidade tenham sido desenvolvidas aplicando o 3R, muitos países ainda utilizam os métodos tradicionais, devido a falta de aceitação a nível regulatório das organizações governamentais para um novo método (KUMAR et al., 2018; RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDER, 2018), sendo ainda mais desafiador quando não há métodos de validação definidos e aceitos por diferentes agências reguladoras (MOREIRA *et al.*, 2020).

Além dos 3Rs já conhecidos, a Comissão da Farmacopeia Europeia (do inglês *European Pharmacopoeia Commission*) declara a importância da instituição de um quarto R, referente a “removal”, ou seja, a necessidade de avaliação crítica dos testes já realizados no controle de qualidade de vacinas e que possam ser descontinuados definitivamente, sem necessidade de substituir por outro teste e, portanto, a remoção dos animais da análise (LANG *et al.*, 2018).

### 2.4.1. Redução (do inglês *Reducing*)

O teste sorológico desenvolvido por equipe de trabalho da Fiocruz para controle de qualidade de vacinas antirrábicas de uso humano, utiliza apenas cinco animais para cada diluição de vacina testada, ou seja, 11 animais a menos por diluição do que o utilizado no tradicional teste de NIH. Além disso, não é realizado desafio com o vírus rábico e sim a coleta de sangue para obtenção do soro sanguíneo e realização da técnica de rápida inibição de focos fluorescentes (do inglês *Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test - RFFIT*) sendo considerado um teste que atende aos critérios de redução e refinamento no uso de animais (MOREIRA *et al.*, 2019), sendo um teste de menor duração, mais preciso e mais econômico do que o NIH (KHALIL; ABOSHANAB; ABOULWAFI, 2022).

Ainda, outra possibilidade seria a redução do número de animais, realizando menos diluições de vacinas testadas, o que é possível à medida que se conhece o produto e também há a experiência de condução do teste de NIH. Na França, esta estratégia foi adotada por três anos, o que poupou o uso de 1590 camundongos na realização do teste de NIH para 53 partidas de vacinas (BRUCKNER *et al.*, 2003).

Além disso, sempre que possível é recomendável o teste de várias vacinas ao mesmo tempo, pois assim permite apenas um grupo de vacina de referência e um grupo testemunho (controle) (BRUCKNER et al., 2003).

#### **2.4.2. Refinamento (do inglês *Refining*)**

É importante se considerar metodologias para minimizar a dor e o sofrimento animal, principalmente daqueles utilizados em testes de potência. Geralmente os animais utilizados nestes testes são submetidos ao desafio de modo a comprovar a eficácia vacinal, dessa forma deve-se estabelecer o “ponto final humanitário” (*humane endpoint*), para que ao verificar a ocorrência da enfermidade decorrente do desafio, o sofrimento animal seja interrompido. O ponto crítico neste caso é determinar qual o momento exato para realizar o *endpoint* humanitário de modo a abreviar o sofrimento animal sem prejudicar os resultados da experimentação (HENDRIKSEN; STEEN, 2000).

O estudo de Hendriksen e Steen (2000) definiu os *endpoints* humanitários para animais pertencentes aos testes de potência da vacina de coqueluche (*Bordetella pertussis*), assim foi definido que se deve avaliar um conjunto de sinais clínicos que caracterizam a doença. Foi evidenciado que alguns sinais, como a perda de peso corpóreo, embora ocorra no curso clínico da doença, avaliado isoladamente não pode ser utilizado para representar a enfermidade, portanto não pode ser usado isoladamente como “ponto final”. Deve-se avaliar o conjunto de sinais clínicos apresentados, inclusive, para que o *endpoint* humanitário seja adequadamente estabelecido deve-se observar os animais em teste, ao menos duas vezes ao dia. Outros *endpoints* foram criados para testes de potência de outras vacinas, tais como: antitetânica de uso humano, antirrábica e contra erisipela. Para os testes de potência de vacinas antirrábicas Bruckner *et al.* (2003) definiram scores para acompanhar a evolução dos sinais clínicos. O *endpoint* humanitário foi caracterizado quando o animal apresentou tremores e convulsão (estágio 3), associados a perda de peso superior a 15%, o que denota sinais neurológicos claros, progressivos e irreversíveis e, portanto, a eutanásia do animal neste momento não prejudica a avaliação do teste.

A vantagem dos métodos sorológicos é que eles permitem uma maior precisão (com baixa variabilidade na mensuração), visto que avaliam títulos de anticorpos em vez de sinais clínicos e mortalidade que podem ser inespecíficos (HENDRIKSEN; STEEN, 2000).

A técnica de anticorpo soroneutralizante é questionada por alguns especialistas, visto que ela possui baixa sensibilidade quando a quantidade de glicoproteínas presentes na vacina é baixa (SCHIFFELERS *et al.*, 2014).

### 2.4.3. Substituição (do inglês *Replacement*)

A substituição pode ser considerada absoluta, quando não há utilização de animais no teste ou parcial, quando ainda são utilizados animais, porém de menor complexidade na escala filogenética de acordo com a Resolução n° 55 de 5 de outubro de 2022 (CONCEA, 2022a).

Algumas técnicas de substituição do uso de animais no controle de qualidade de vacinas já ocorrem, tal como nas vacinas antirrábicas e contra leptospirose. Em geral técnicas *in vitro* estão em desenvolvimento através da caracterização físico-química e imuno-química da vacina (HENDRIKSEN; STEEN, 2000).

Um entrave comum na aceitação dos métodos *in vitro* ocorre na aceitação da nova metodologia, disponibilidade dos materiais pelos laboratórios que executarão a nova técnica e na precaução na aceitação da nova metodologia por parte dos órgãos regulatórios (HENDRIKSEN; STEEN, 2000). Além disso, a maioria das vacinas inativadas é dependente de desafio *in vivo* para que seja possível avaliar a resposta imune do animal.

As técnicas que permitem a substituição completa dos animais geralmente mensuram a quantidade de imunógeno presente na vacina (MOREIRA *et al.*, 2020).

Uma das alternativas estudadas é a substituição do desafio em animais por avaliação da resposta imune através de testes sorológicos para dosagem dos níveis de anticorpos, tais como ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA), hemaglutinação ou cultura de células (HENDRIKSEN; STEEN, 2000). O teste de ELISA desenvolvido por Sigoillot-Claude *et al.* (2015), demonstrou-se capaz de avaliar a potência de vacinas antirrábicas de uso veterinário, tanto do produto acabado quando de amostras em processo de produção, este método quantifica a glicoproteína G (importante na formação de anticorpos neutralizantes), e utiliza anticorpos monoclonais, que muitas vezes pode ter suas características alteradas por agentes que inativam o vírus da raiva durante a formulação da vacina inativada (CHABAUD-RIOU *et al.*, 2017) prejudicando a detecção dela. Todavia, foram desenvolvidas metodologias que permitiram tornar o ELISA comparável ao NIH, mesmo

nestas situações (TOINON *et al.*, 2019). No Brasil, há um grupo de estudos na Fiocruz, que participa de um teste de validação internacional da metodologia de ELISA para avaliação da eficácia de vacinas antirrábicas de uso humano. Os estudos encontram-se em etapa avançada e na fase de validação (MASSOTE, 2022).

Uma proposta mais sensível que o teste de ELISA é a técnica de fluoroimunoensaio tempo-dependente (TRFIA), que é capaz detectar apenas as glicoproteínas G realmente imunogênicas (MOREIRA *et al.*, 2020).

Em estudo de Kawahara *et al.* (2021) foi desenvolvido uma metodologia capaz de avaliar a inativação viral das vacinas antirrábicas inativadas de uso humano, utilizando a cultura em células Neuro-2A, seguido de ELISA, o que demonstrou ser eficaz e mais rápido que o teste tradicional realizado em animais.

A partir da criação de novas metodologias de análise de testes de controle de qualidade, deve-se considerar vários fatores, tais como: equivalência com o método já padronizado, repetibilidade intra e interlaboratorial. O processo de validação pode ser muito caro e demorado, por isso acredita-se que muitas metodologias não sejam implantadas pelos órgãos oficiais (HENDRIKSEN; STEEN, 2000). Além disso, para que o método seja incorporado, ele deve ser financeiramente viável.

Em entrevista realizada por Schiffelers *et al.* (2014), 82% das pessoas acreditam que a implantação dos 3Rs na liberação de vacinas antirrábicas é capaz de reduzir o tempo de liberação da vacina e inclusive pode ser mais barato, porém para avaliação de custo deve-se considerar que o tempo de transição para a nova metodologia de acordo com o 3R pode consumir tempo.

Os entraves para aceitação de um novo método que avalie a potência de vacinas antirrábicas trata-se, em pesquisa realizada por Schiffelers *et al.* (2014) trata-se do receio de liberação de vacinas abaixo da especificação com o uso do novo método, dificuldade para aceitação mundial do novo método implantado, visto que a comercialização de vacinas entre países seria realizada com diferentes testes de potência.

#### **2.4.4. Melhorias nas técnicas diagnóstico de raiva**

O teste de inoculação em camundongos é considerado pelo Ministério da Saúde, o teste confirmatório para diagnóstico da raiva. A tendência é que este teste seja substituído pelo isolamento viral em cultura celular.

Em 2007, Castilho e colaboradores realizaram um estudo comparativo entre os testes de isolamento viral em camundongos, cultura celular em neuroblastoma murino (N2A) e imunofluorescência direta, os resultados obtidos demonstraram similaridade entre o teste de inoculação em camundongos e cultura celular em amostras provenientes de morcego (CASTILHO *et al.*, 2007).

Desta forma, desde 2004 todas as amostras provenientes de morcegos, após o teste de imunofluorescência direta, são encaminhadas para a cultura celular, sendo desnecessário o teste em camundongos (CASTILHO *et al.*, 2007). O mesmo não ocorre para amostras de cães, raposas e equinos, visto que nestes casos não houve similaridade entre os diferentes testes. A vantagem do diagnóstico em camundongos é a capacidade de detectar o vírus mesmo quando presente em baixas quantidades, enquanto o teste de imunofluorescência direta pode não ter a mesma sensibilidade, o que pode ser devido a fatores como condições de preservação da amostra e também fragmento selecionado para o diagnóstico (CASTILHO *et al.*, 2007).

Em estudo realizado por Corona *et al.*, 2018, 400 amostras foram selecionadas para um teste comparativo entre o teste de inoculação em camundongos e a cultura celular. A sensibilidade do teste de cultura celular foi de 100%, enquanto que a especificidade foi de 99,7%.

Ambos os autores (CASTILHO *et al.*, 2007; CORONA *et al.*, 2018) verificaram algumas vantagens do teste de cultura celular em relação ao teste de inoculação em camundongos: menor risco ao trabalhador, não uso de animais, menor tempo de análise e menor custo.

Embora haja muitas vantagens na implantação do teste de cultura celular, ele ainda se demonstra um método que não é capaz de substituir completamente o teste de inoculação em camundongos, principalmente em algumas espécies (equinos e carnívoros), devido a menor sensibilidade *in vitro* em relação aos testes *in vivo* (MORI, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2022) (comunicação pessoal)<sup>1</sup>.

## 2.5. PROTOCOLOS ANESTÉSICOS EM CAMUNDONGOS

Os protocolos anestésicos mais comumente utilizados em animais de laboratório envolvem o uso de cetamina, xilazina, propofol via injetável e na anestesia inalatória envolve o uso de isoflurano e sevoflurano. A anestesia pode levar a alteração de parâmetros como gasometria, pressão sanguínea, temperatura corporal e fluxo sanguíneo cerebral (CICERO *et al.*, 2018).

<sup>1</sup> Informação fornecida pelo Prof. Dr. Enio Mori.

De acordo com Fleischmann *et al.* (2016), os camundongos devem ser monitorados por 24 horas após a anestesia quanto a parâmetros como frequência cardíaca, temperatura corporal e avaliação de dor. Alguns anestésicos podem causar alteração no fluxo sanguíneo cerebral e afetar o metabolismo cerebral em decorrência de alteração da temperatura corporal, duração prolongada da anestesia, hiperglicemia (CICERO *et al.*, 2018).

Em revisão sistemática de Cicero *et al.* (2018) foi detectada a necessidade de detalhamento dos protocolos anestésicos utilizados nos estudos publicados em artigos científicos, além de guias específicos de animais de laboratório para procedimentos anestésicos. Ahmadi-Noorbakhsh *et al.* (2022) relatam as dificuldades em estabelecer protocolos analgésicos e anestésicos satisfatórios para camundongos, o que decorre de fatores como falhas nos treinamentos dos pesquisadores que realizam os procedimentos, particularidades da espécie, uma vez que estes animais possuem um metabolismo acelerado e, portanto, se recuperam mais rapidamente da anestesia, possuem uma baixa reserva de glicogênio hepático, o que predispõe a hipoglicemia, escassez de equipamentos adequados quando comparado a outras espécies animais e o tamanho dos animais, que dificulta a realização de alguns procedimentos.

Os protocolos anestésicos em camundongos que apresentam rápida recuperação tendem a apresentar menor mortalidade, visto que são reduzidas as probabilidades de hipotermia e hipóxia (CHEN *et al.*, 2015).

### **2.5.1. Injetáveis**

Em geral os protocolos anestésicos injetáveis usados para camundongos são baseados em associações de drogas dissociativas e ou opioides com tranquilizantes ou sedativos  $\alpha$ -2 agonistas (KAWAI *et al.*, 2011).

O procedimento de inoculação intracerebral em camundongos é realizado na etapa de inoculação do vírus rábico, 14 dias após a primovacinação no teste de potência de vacinas antirrábicas inativadas. Também pode ser realizado durante a multiplicação do vírus rábico para utilização nestes testes (banco viral) e nos casos de diagnóstico da raiva em camundongos.

De acordo com a classificação de graus de invasividade descrito na Resolução nº55 de 5 de outubro de 2022 (CONCEA, 2022a), o procedimento de inoculação

intracerebral pode ser classificado como G3 devido a dor, estresse, desconforto e dor de intensidade intermediária.

O manual “*Laboratory Techniques in Rabies 5ª edição*” da OMS (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDER, 2018) recomenda que seja utilizada anestesia previamente à inoculação, pois se trata de um procedimento doloroso e que pode levar o animal ao choque (BRUCKNER *et al.*, 2003). A anestesia deve ser rápida e segura. Entre as opções de protocolo anestésico, recomenda-se a anestesia inalatória devido a rápida indução e recuperação, com a vantagem que é possível anestésiar os animais dentro da própria caixa e, com experiência as pessoas podem anestésiar até 10 camundongos em 2 minutos (BRUCKNER *et al.*, 2003).

A inoculação intracerebral deve ser feita por pessoas capacitadas, visto que mesmo que seja feita corretamente pode haver dano cerebral, inclusive por isso se considera a mortalidade ocorrida antes do 4º ou 5º dia como inespecífica (BRUCKNER *et al.*, 2003) e os sinais observados podem ser desde morte súbita, ataxia ou andar em círculos (BRUCKNER *et al.*, 2003).

- Cetamina: causa imobilidade e deve ser utilizada em associação com xilazina ou benzodiazepínico com a finalidade de analgesia, relaxamento muscular e sedação (MEYER, R.E.; FISH, 2008). Causa moderada depressão respiratória e aumento da pressão sanguínea. Aumenta o tônus muscular, pode causar alucinações durante a recuperação (FLECKNELL, 2016). A associação de cetamina e xilazina pode levar a redução da pressão arterial, a associação de 100 mg/kg de Cetamina + 5 mg/kg de Xilazina pela via intramuscular reduziu de 129 para 100 mmHg quando aplicada em camundongos BALB/c (MEYER; FISH, 2008). A associação de 150 mg/kg de Cetamina + 15 mg/kg de Xilazina pela via intraperitoneal em camundongos SvEv/Tac reduziu de 658 para 293 batimentos por minuto (MEYER; FISH, 2008; YANG *et al.*, 1999). Além disso, a associação pode causar alteração nos níveis de oxigênio e CO<sub>2</sub> no sangue e elevação da glicemia (MEYER; FISH, 2008). A associação cetamina + xilazina produz um efeito transitório e não significativo de redução nos níveis de anticorpos em até uma semana entre o uso e a exposição ao antígeno (LOCKWOOD *et al.*, 1993). A cetamina pode causar o aumento do fluxo sanguíneo cerebral (SCHWEDLER; MILETICH; ALBRECHT, 1982) e até mesmo causar lesões denominadas lesões de Olney (AUER, 1996). A associação de cetamina + xilazina é um dos protocolos mais utilizados para camundongos, em geral as doses de uso variam de 60 a 150 mg/kg para cetamina associado a 4,1 a 20 mg/kg de xilazina (TSUKAMOTO *et al.*, 2015), em baixas doses

não é capaz de induzir a anestesia cirúrgica sendo recomendável a inclusão de acepromazina no protocolo anestésico e, quando necessária a reaplicação deve ser feita com cautela, pois se realizada no momento errado pode causar a mortalidade dos animais (NAVARRO *et al.*, 2021).

- Xilazina: é um agonista  $\alpha$ -2 adrenérgico que promove analgesia leve a moderada e pode potencializar o efeito de outras drogas. Como efeitos adversos pode causar depressão respiratória e cardiovascular (hipotensão) (FLECKNELL, 2016), além de ressecamento corneal e opacidade transitórios (MEYER; FISH, 2008). Pode ser usado sozinho ou associado para proporcionar efeitos de sedação, imobilização e anestesia. Quando utilizada sozinha não causa sonolência ou perda de reflexo postural.

- Cloridrato de tramadol é um opióide sintético de aplicação no tratamento de dor moderada a intensa (SOUSA; ASHMAWI, 2015).

- Acepromazina promove sedação leve e a potencialização do efeito dos anestésicos, pode causar hipotensão moderada e redução da termorregulação (FLECKNELL, 2016).

- Tiletamina/Zolazepam (Zoletil<sup>®</sup>50 – Virbac): cada frasco é composto por 125,0 mg de cloridrato de tiletamina e 125,0 mg de Cloridrato de Zolazepam. A tiletamina é uma feniciclida e o zolazepam pertence à família dos benzodiazepínicos, o que permite uma anestesia geral profunda, com ação cataléptica rápida e sem agitação, seguida de relaxamento, uma ação analgésica superficial, visceral. Os reflexos laríngeos, faríngeos e palpebrais são mantidos, não há depressão bulbar. O efeito analgésico possui duração maior que o anestésico (informações da bula). Como efeito colateral pode haver sialorreia, em altas doses pode causar bradipneia, pode haver hipotermia em virtude do relaxamento muscular (LIN *et al.*, 1993). De acordo com o Guia de anestesia e analgesia para ratos e camundongos (UFRGS, 2016), o uso deste medicamento é recomendável na dose de 20 a 40 mg/kg pela via intraperitoneal, proporcionando 15 a 25 minutos de analgesia leve, portanto requer a associação de analgésicos para uma sedação mais profunda. De acordo com (MEYER; FISH, 2008), na proporção 1:1 de tiletamina e zolazepam, é capaz de induzir e manter a anestesia por cerca de 30 minutos, com o intuito de reduzir os eventos adversos e aumentar a efetividade, deve ser associado à xilazina ou metadetomidina ou a cetamina + xilazina. Em camundongos, o uso exclusivo da associação tiletamina/zolazepam, mesmo em doses elevadas ( $\geq 80$  mg/kg) não elimina a nocicepção (MEYER; FISH, 2008; SILVERMAN *et al.*, 1983). No entanto, doses mais elevadas da associação tiletamina/zolazepam em camundongos, entre 100 a 160 mg/kg,

podem provocar dificuldades respiratórias e consequente óbito (SILVERMAN *et al.*, 1983).

Em estudo realizado por Do Carmo Alonso *et al.* (2008) os camundongos anestesiados pela via intramuscular apenas com a associação tiletamina/zolazepam mesmo em doses altas como 80 mg/kg não apresentaram analgesia e miorelaxamento suficientes para uma celiotomia. Por outro lado, a associação de 3 mg/kg de levomepromazina com 40 mg/kg de tiletamina/zolazepam foi eficaz na promoção de analgesia e miorelaxamento para celiotomia, quadruplicou o tempo de imobilização e duplicou o de recuperação.

Em estudo de Chen *et al.* (2015) o protocolo anestésico em camundongos da linhagem Kunming heterogênicos pela via intraperitoneal que resultou em melhor analgesia e boa recuperação foi associado com 80 mg/kg de tiletamina/zolazepam, 10 mg/kg de xilazina e 15 mg/kg de tramadol.

Em estudo de Cagle *et al.* (2017) foram realizados testes de protocolos anestésicos para aplicação de sonda uretral em camundongos BALB/c isogênicos machos e o que apresentou maior ocorrência de sedação e duração adequada foi a associação de dexmedetomidina 0,2 mg/kg + tiletamina/zolazepam 40 mg/kg e butorfanol 3 mg/kg. Neste trabalho, o plano anestésico só foi alcançado com sucesso quando se associava tiletamina/zolazepam com droga opioide. O sedativo dexmedetomidina foi responsável por efeitos adversos em machos resultando em maior ocorrência de obstrução uretral e consequente maior mortalidade.

### **2.5.2. Inalatórios**

Os anestésicos inalatórios mais utilizados atualmente são isoflurano e sevoflurano.

Dentre as características desejáveis dos anestésicos inalatórios, é esperado que eles possuam baixa solubilidade no sangue, o que proporciona um controle mais acurado do plano anestésico, não deve causar irritação no sistema respiratório, deve ser estável, não metabolizável, não afetar o sistema cardiovascular e respiratório, chegar ao sistema respiratório de maneira eficaz e possuir custo acessível (BRUNSON, 2008).

A principal vantagem dos anestésicos inalatórios é que eles podem ser facilmente controlados quanto a quantidade fornecida e mesmo a retirada, o que é

diferente do anestésico injetável, onde não é possível retirar a quantidade inoculada e também não há um antagonista para todos os medicamentos utilizados.

O mecanismo de ação se baseia na inalação do anestésico e provável interação com os canais iônicos das membranas nervosas, em seguida há aumento do neurotransmissor inibitório de GABA. Os anestésicos inalatórios interagem principalmente com GABA que causa ao neurônio um aumento da permeabilidade ao cloro (BRUNSON, 2008).

O isoflurano quando comparado aos demais anestésicos inalatórios, preserva a função cardiovascular, pode causar uma depressão da pressão sanguínea dependente da dose aplicada de anestésico (TSUKAMOTO *et al.*, 2015). O isoflurano aumenta o fluxo sanguíneo cerebral, o que pode ser prevenido com o uso da hiperventilação previamente ao uso do anestésico. Também é caracterizado por ser um depressor respiratório, alterando os níveis de CO<sub>2</sub> no sangue (BRUNSON, 2008) e reduzindo a frequência respiratória para 40 a 100 movimentos por minuto (mpm) (NAVARRO *et al.*, 2021).

A dose anestésica de 1,5 a 2,5% de isoflurano é capaz de anestésiar os camundongos e atingir o plano cirúrgico (NAVARRO *et al.*, 2021).

Os riscos ocupacionais associados à exposição ao isoflurano ainda não são completamente conhecidos, porém as legislações internacionais recomendam que a exposição média ao isoflurano não ultrapasse 2 ppm considerando um dia de trabalho de 8 horas, para isso deve-se usar medidas preventivas como inspeção periódica do equipamento de anestesia inalatória contra vazamentos, treinamentos para uso do equipamento e atenção ao uso dos equipamentos de proteção indicados na ficha de segurança do anestésico (California Department of Public Health, 2021).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Propor um protocolo anestésico injetável eficaz e seguro, para uso em grande número de animais previamente à inoculação intracerebral realizada no teste de NIH. Comparar este procedimento injetável com a anestesia inalatória em relação ao desempenho e custos (insumos, mão de obra e equipamentos).

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

##### **3.2.1. Definir um protocolo anestésico injetável mais efetivo que:**

- Não necessite de reaplicação;
- Tenha sucesso  $\geq 80\%$  na indução da anestesia;
- Tenha duração de anestesia cirúrgica superior a 16 minutos;
- Não haja mortalidade dos animais;
- Ocorra o ganho de peso dos animais após sete dias de realização da anestesia.

##### **3.2.2. Comparar os protocolos injetável e o inalatório, a fim de realizar a simulação da etapa de inoculação intracerebral realizada no teste de NIH e determinar qual dos protocolos é mais viável considerando:**

- Tempo gasto no procedimento
- Custo de realização considerando equipamentos, insumos e mão de obra
- Influência nos resultados do título viral (CVS/31).

## 4. EXPERIMENTO 1

**Avaliação de três protocolos anestésicos injetáveis: G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol)**

### 4.1. INTRODUÇÃO

A primeira etapa do trabalho consistiu na seleção de um protocolo anestésico injetável, que fosse aplicado pela via intraperitoneal, sem necessidade de aplicação de dose adicional, ou seja, uma vez por animal. Ainda, o protocolo deveria apresentar uma porcentagem de indução superior a 80% dos animais inoculados e o tempo de anestesia cirúrgica deveria ser por tempo suficiente para que houvesse a aplicação do inóculo pela via intracerebral em todos os animais do mesmo grupo. Considerando que um operador com prática demora no máximo um minuto para fazer a inoculação intracerebral em um animal e que um grupo é composto por 16 animais, então foi estabelecido que o tempo de anestesia cirúrgica deveria ser  $\geq 16$  minutos.

A definição dos medicamentos e respectivas doses anestésicas foram baseadas no estudo desenvolvido por Conceição *et al.* (2022). Neste, dentre os protocolos anestésicos injetáveis, o que apresentou melhores resultados foi a associação de 100 mg/kg de cetamina + 10 mg/kg de xilazina + 2 mg/kg de acepromazina + 5 mg/kg de tramadol, em que 100% dos animais testados apresentaram anestesia cirúrgica com eficiência na promoção da hipnose, relaxamento muscular, perda de reflexos e analgesia. Todavia, durante a anestesia houve mortalidade de dois animais dos 16 testados (12,5%), além disso o plano anestésico teve uma durabilidade longa, de 79,36 minutos, sendo 35 minutos de anestesia cirúrgica. Devido a mortalidade observada no experimento realizado por Conceição *et al.* (2022), neste estudo foi testado o mesmo protocolo anestésico com redução da dose fornecida de acepromazina, isto porque essa droga potencializa o efeito dos anestésicos e a fim de evitar um prejuízo na termorregulação.

Além disso, foi proposto outro grupo nos quais os animais foram inoculados com Zoletil®50 (Virbac), associação de um anestésico dissociativo cloridrato de tiletamina com o agente benzodiazepínico cloridrato de zolazepam, que é utilizado para cirurgias profundas, como celiotomia e pode ser indicado para o uso em procedimentos invasivos de curta duração, tais como inoculação intracerebral.

## 4.2. MATERIAIS E MÉTODOS DO EXPERIMENTO 1

### 4.2.1. Delineamento experimental

Na primeira etapa foram utilizados 30 camundongos (15 ♀ e 15 ♂) heterogênicos da linhagem *Swiss Webster* com 5 semanas de idade provenientes da colônia do Biotério do Instituto Pasteur. Os animais foram distribuídos em grupos experimentais conforme descrito no Quadro 3.

Quadro 3 - Protocolo anestésico de acordo com o grupo experimental

Grupo	Número de animais	Cetamina (mg/kg)	Xilazina (mg/kg)	Acepromazina (mg/kg)	Tramadol (mg/kg)	Tiletamina + zolazepam (mg/kg)
G1	5♂ + 5♀	100	10	1	5	---
G2	5♂ + 5♀	100	8	1	5	---
G3	5♂ + 5♀	---	8	---	5	50

Fonte: Pereira (2023).

Neste estudo foram utilizados cloridrato de cetamina 11,6g - equivalente a 10g de cetamina base/ 100 mL (0,1 g/mL) - (Dopalen injetável – CEVA Saúde Animal LTDA), cloridrato de xilazina 2,3g - equivalente a 2g de xilazina base/100 mL (0,02 g/mL) - (Anasedan injetável – CEVA Saúde Animal LTDA), maleato de acepromazina 2mg/mL (Apromazin 0,2% injetável – Syntec do Brasil LTDA), cloridrato de tramadol 50 mg/mL (Tramal 50mg injetável - Laboratórios Pfizer LTDA) e Zoletil® 50 - cloridrato de tiletamina 125mg + cloridrato de zolazepam 125mg em 5 mL de diluente estéril - equivalente a 25 mg/mL de cloridrato de tiletamina + 25 mg/mL de cloridrato de zolazepam - (Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA).

### 4.2.2. Administração

Os fármacos foram diluídos no momento do uso e o excedente descartado após a utilização.

A administração foi realizada com agulha 13 x 0,45 mm acoplada a seringa de 1 mL com subdivisões a cada 0,02 mL, sendo utilizada uma seringa e agulha por animal.

Dado que a concentração fornecida de cada anestésico por animal é pequena, então optou-se por realizar a diluição de cada fármaco, de modo que a solução final contendo todos os anestésicos não ultrapassou 250 µL para um animal de 25g.

Para isso, os fármacos foram diluídos em solução fisiológica NaCl 0,9% e acondicionados no mesmo frasco para o fornecimento de uma dose única. O critério de arredondamento de volume aplicado para cada animal foi o ajuste para o volume acima, de acordo com a graduação da seringa (APÊNDICE A). O procedimento de diluição para cada grupo foi:

- Grupo 1:

Os anestésicos cetamina (100 mg/mL), xilazina (20 mg/mL), acepromazina (2 mg/mL) e tramadol (50 mg/mL) foram diluídos nas proporções 1:2, 1:4, 1:4 e 1:20, respectivamente.

- Grupo 2:

Os anestésicos cetamina (100 mg/mL), xilazina (20 mg/mL), acepromazina (2 mg/mL) e tramadol (50 mg/mL) foram diluídos nas proporções 1:2, 1:5, 1:4 e 1:20, respectivamente.

- Grupo 3:

O anestésico Zoletil<sup>®</sup>50 foi reconstituído no diluente fornecido juntamente com o medicamento, conforme instruções da bula, sendo obtida a concentração de 50 mg/mL. Uma alíquota deste foi diluída a 1:2 e misturada aos anestésicos xilazina (20 mg/mL) e tramadol (50 mg/mL) nas proporções de 1:5 e 1:20, respectivamente.

#### **4.2.3. Seleção dos animais**

A seleção dos animais ocorreu no momento D0. Apenas foram incluídos no trabalho os animais que atenderam aos critérios de inclusão (item 4.2.4).

#### **4.2.4. Critérios de inclusão**

Foram incluídos apenas camundongos heterogênicos da linhagem *Swiss Webster* provenientes da mesma origem (Biotério do Instituto Pasteur), saudáveis, com cinco semanas de idade e peso de 20 a 31 g.

Os animais foram incluídos à medida que houve disponibilidade na criação, dessa forma o estudo foi conduzido em etapas, sendo para os grupos G1, G2 e G3, três, uma e duas etapas, respectivamente.

#### **4.2.5. Critérios de exclusão**

Não foram incluídos camundongos de diferentes origens, que não estivessem saudáveis ou que não estivessem com 5 semanas de idade ou que não estivessem com peso de 20 a 31 g.

#### **4.2.6. Aclimação**

Não houve necessidade de aclimação, pois os animais permaneceram no mesmo ambiente desde o desmame.

#### **4.2.7. Identificação**

No D0 os animais foram pesados individualmente e identificados com tintura Henna creme cor castanho escuro (Surya Brasil) aplicada em diferentes partes do corpo. Além disso, os animais foram distribuídos aleatoriamente em mini-isoladores identificados com os dados do grupo experimental, respeitando o agrupamento que foi feito no desmame, para que não houvesse o estresse de reagrupamento dos animais e possíveis brigas.

#### **4.2.8. Destino dos animais**

Ao término do experimento todos os animais foram submetidos à eutanásia. As carcaças foram autoclavadas e descartadas conforme procedimento interno do Instituto Pasteur.

#### **4.2.9. Eutanásia**

Os animais em plano anestésico foram submetidos à eutanásia através de overdose de CO<sub>2</sub> em câmara apropriada.

#### **4.2.10. Alojamento**

Os camundongos foram divididos de acordo com o grupo experimental e sexo, sendo alocados de um a três animais em cada mini-isolador de 21,5 cm de largura x 31,6 cm de comprimento x 20,7 cm de altura (679,4 cm<sup>2</sup>, 226 cm<sup>2</sup>/animal).

Os mini-isoladores foram mantidos em racks ventiladas com pressão negativa (Rack ventilada ALN para camundongos – Alesco<sup>®</sup>) e forradas com maravalha, que eram substituídas uma vez por semana.

A temperatura ambiente foi controlada entre 22 e 26°C e umidade relativa de 40 a 60%. O fotoperíodo foi de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água autoclavada disponibilizada em bebedouros com bico e ração irradiada apropriada para a espécie NUVILAB CR-1 (Quimtia SA) durante todo o período experimental.

#### **4.2.11. Cuidados durante o período anestésico**

De acordo com Flecknell (2016) a temperatura ambiente deve ser controlada entre 27 e 30°C. Neste estudo a temperatura ambiente não foi mensurada, porém o ambiente foi mantido aquecido durante todo o período pré-anestésico até o momento da recuperação da anestesia através do uso de aquecedor a óleo sob a mesa cirúrgica onde foi realizado o procedimento e através do aquecimento do ar ambiente com o uso de aparelho de ar-condicionado ajustado entre 25 e 27°C.

Foi aplicada pomada ocular lubrificante carbômer 2 mg/g (Vidisic<sup>®</sup> Gel – Bausch+Lomb) após a sedação de modo a prevenir o ressecamento ocular.

#### **4.2.12. Parâmetros para avaliação do protocolo anestésico**

##### **4.2.12.1. Monitoramento do plano anestésico**

O monitoramento do plano anestésico foi avaliado conforme descrito por Smith (1993) a cada cinco minutos através da avaliação dos reflexos: podal (compressão do espaço interdigital dos membros posteriores com pinça anatômica), caudal (compressão da extremidade da cauda com pinça anatômica) e postural (reflexo de endireitamento). Foram mensuradas as etapas:

- Tempo de indução: caracterizado pelo tempo entre a administração dos fármacos e perda dos reflexos podal e caudal.
- Tempo de anestesia cirúrgica: perda de reflexo total até o retorno de pelo menos um deles.
- Tempo de recuperação: tempo entre a recuperação de um dos reflexos e retorno do reflexo postural.
- Tempo total de plano anestésico: somatório do tempo de indução, anestesia e recuperação.

Os tempos de indução, anestesia cirúrgica e recuperação foram calculados baseados na média de cada grupo, mesmo quando não houve sucesso na indução.

Para o parâmetro de tempo total de plano anestésico foi calculado o tempo total médio apenas dos animais que apresentaram sucesso na indução e que, portanto, alcançaram o plano de anestesia cirúrgica.

#### 4.2.12.2. Movimentos respiratórios

A frequência respiratória foi avaliada através da contagem manual de movimentos respiratórios e foi registrada em movimentos respiratórios por minuto. Quando a contagem foi superior a 200 movimentos por minuto, foi registrado como >200. A frequência respiratória normal de um camundongo varia de 215 a 230 movimentos respiratórios por minuto (BRAUN *et al.*, 2012) sendo que em plano anestésico pode chegar em 55 a 100 movimentos respiratórios por minuto (UNIT FOR LABORATORY ANIMAL MEDICINE, 2022).

O monitoramento foi realizado a cada cinco minutos e se iniciou a partir da perda de reflexo postural até a recuperação do animal.

#### 4.2.12.3. Temperatura corpórea

A temperatura corpórea foi avaliada através do uso do termômetro clínico digital infravermelho sem contato (G-TECH) direcionado para a região abdominal do animal. O monitoramento foi realizado a cada cinco minutos e se iniciou a partir da perda de reflexo postural até a recuperação do animal. A faixa de medição do termômetro é de 34,0 °C a 42,2°C (Figura 2).

A temperatura normal do camundongo é de 36 a 38°C (UNIT FOR LABORATORY ANIMAL MEDICINE, 2022).

Figura 2 - Termômetro infravermelho e pinça anatômica utilizados para aferição dos parâmetros durante o período anestésico



Fonte: Pereira (2023).

#### 4.2.12.4. Ganho de peso

A avaliação do ganho de peso diário foi realizada através da pesagem individual dos animais no período de D0 ao D+7 com auxílio de uma balança de precisão 0,001g modelo M723i (Bel equipamentos analíticos LTDA).

O ganho de peso semanal foi calculado através da diferença entre o peso obtido no D+7 e o peso inicial (D0) para cada animal.

#### 4.2.12.5. Eventos adversos dos protocolos anestésicos

Para verificação de possíveis eventos adversos decorrentes da anestesia foram avaliados visualmente: sialorreia, cianose, vocalização e mortalidade.

#### 4.2.13. Análise estatística

Foram realizadas análises estatísticas dos parâmetros: temperatura corpórea, tempo de indução anestésica, tempo de anestesia cirúrgica, tempo de recuperação médio,

tempo total de anestesia e ganho de peso médio. Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism version 9.3 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, submetidos aos testes de normalidade Shapiro & Wilk e Kolmogorov & Smirnov e o de homocedasticidade pelo teste de Levene. Para comparação entre os grupos foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de um fator seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. A comparação entre os sexos foi realizada através do teste T de Student e considerou-se como significativo quando  $p < 0,05$ .

### 4.3. RESULTADOS DO EXPERIMENTO 1

#### 4.3.1. Monitoramento do plano anestésico

Após a administração intraperitoneal dos fármacos, o período de latência ocorreu sem excitação, desconforto local ou dor em todos os animais avaliados.

Para o tempo de indução anestésica, observou-se que apenas 50% dos animais dos grupos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) (2♀ e 3♂) e G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) (3♀ e 2♂) apresentaram sucesso na indução (decúbito lateral, perda de reflexo postural e caudal após a administração dos anestésicos) e não houve diferença significativa entre os tempos médios de indução nestes grupos. Enquanto que o grupo G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) apresentou maior porcentagem de animais induzidos (90%), em que não houve indução de uma fêmea, e o tempo de indução foi significativamente superior aos grupos G1 e G2 (Tabela 1, Gráfico 3).

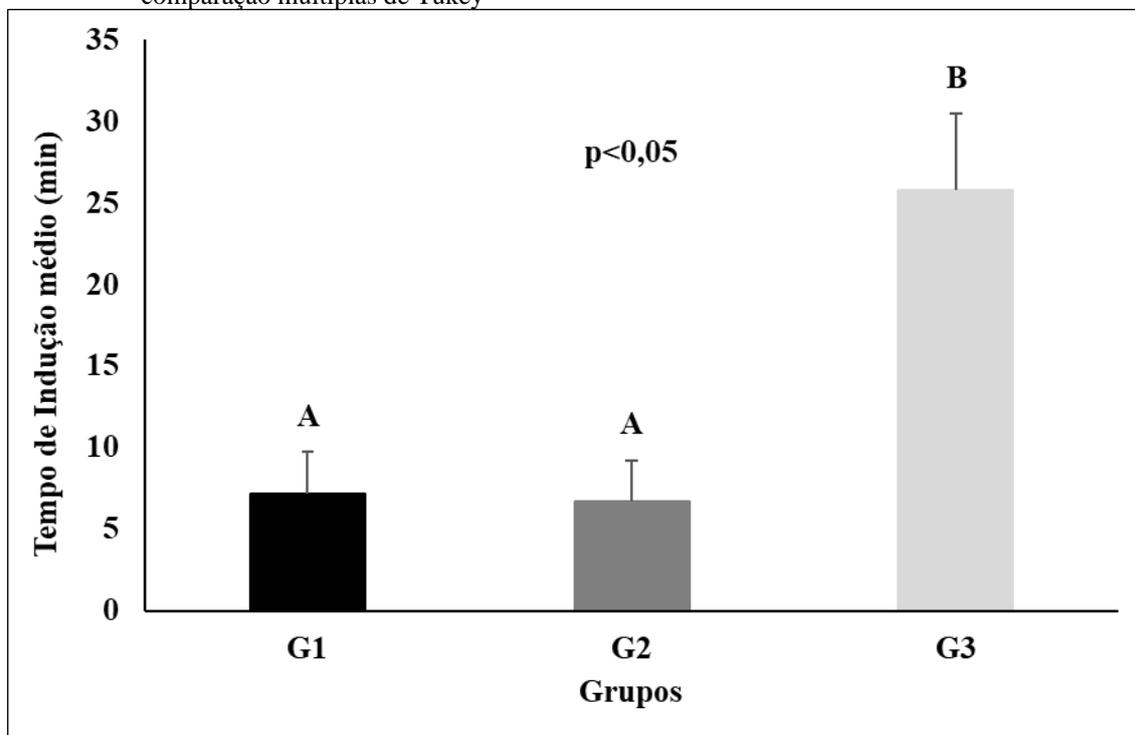
Tabela 1 - Porcentagem de sucesso na indução anestésica, porcentagem de anestesia cirúrgica e média e erro padrão dos tempos anestésicos para cada grupo experimental de dez animais. Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey

Parâmetros avaliados	Protocolos anestésicos		
	G1	G2	G3
Porcentagem de sucesso na indução (%)	50 (5/10)	50 (5/10)	90 (9/10)
Porcentagem de anestesia cirúrgica (%)	50 (5/10)	50 (5/10)	90 (9/10)
	Tempo anestésico (min)		
Indução	7,2 ± 2,5 <sup>A</sup>	6,7 ± 2,5 <sup>A</sup>	25,8 ± 4,7 <sup>B</sup>
Anestesia cirúrgica	12,5 ± 4,7 <sup>A</sup>	14,0 ± 6,1 <sup>A</sup>	41,5 ± 10,5 <sup>B</sup>
Recuperação	13,3 ± 4,9 <sup>A</sup>	15,4 ± 5,0 <sup>A</sup>	18,7 ± 5,1 <sup>A</sup>
Tempo total	55,0 ± 10,7 <sup>A</sup>	45,1 ± 11,9 <sup>A</sup>	95,6 ± 6,4 <sup>B</sup>

Fonte: Pereira (2023).

Letras diferentes significam  $p < 0,05$ .

Gráfico 3 - Representação da média e o erro padrão média do tempo de indução em minutos (min). Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey

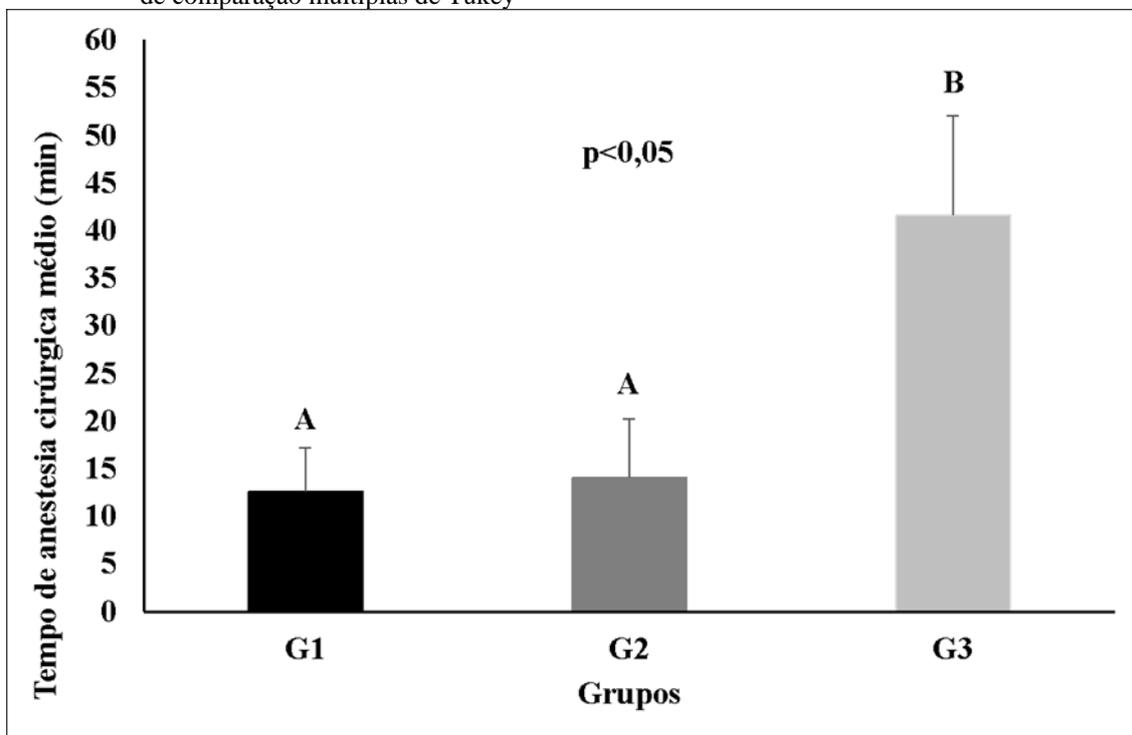


Fonte: Pereira (2023).

Letras diferentes significam  $p < 0,05$ .

Considerando o sucesso da anestesia cirúrgica, houve 90% no grupo G3 e 50% nos grupos G1 e G2. Quanto a duração, não houve diferença entre os grupos G1 e G2, todavia o grupo G3 apresentou tempo significativamente superior aos demais grupos (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Representação da média e o erro padrão média do tempo de anestesia cirúrgica em minutos (min). Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey

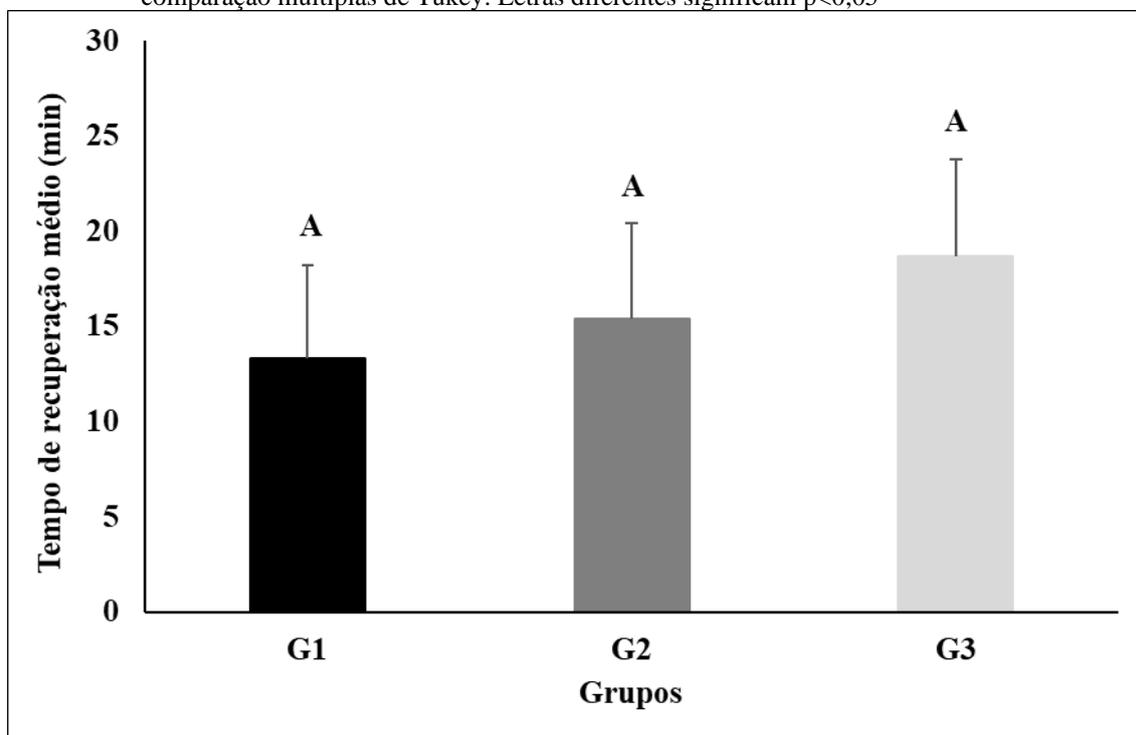


Fonte: Pereira (2023).

Letras diferentes significam  $p < 0,05$ .

Quanto ao tempo de recuperação, não houve diferença estatística entre os grupos (Gráfico 5).

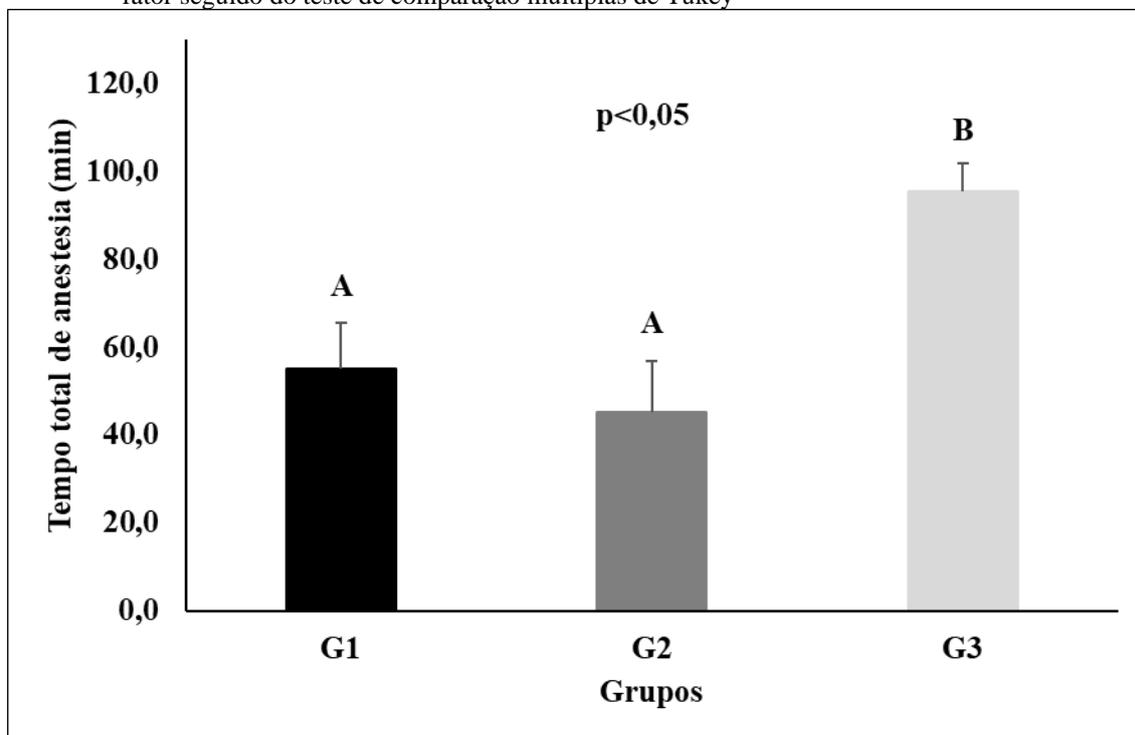
Gráfico 5 - Representação da média e o erro padrão média do tempo de recuperação em minutos (min). Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey. Letras diferentes significam  $p < 0,05$



Fonte: Pereira (2023).

O tempo total de anestesia de G3 foi significativamente superior a G1 e G2 tendo uma duração total de 95,6 minutos (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Representação da média e o erro padrão média do tempo total de indução, cirurgia e recuperação em minutos (min). Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey



Fonte: Pereira (2023).

Letras diferentes significam  $p < 0,05$ .

#### 4.3.2. Frequência respiratória

Os movimentos respiratórios não foram avaliados estatisticamente, apenas acompanhado durante o estudo, visto que o limiar possível para contar visualmente era muito próximo da frequência respiratória normal e porque a comparação estatística se torna inviável, visto que o retorno dos animais da anestesia ocorre em momentos diferentes, não sendo possível a comparação (Tabela 2). Houve redução dos movimentos nos três grupos, entretanto após certo período todos se restabeleceram (Gráfico 7).

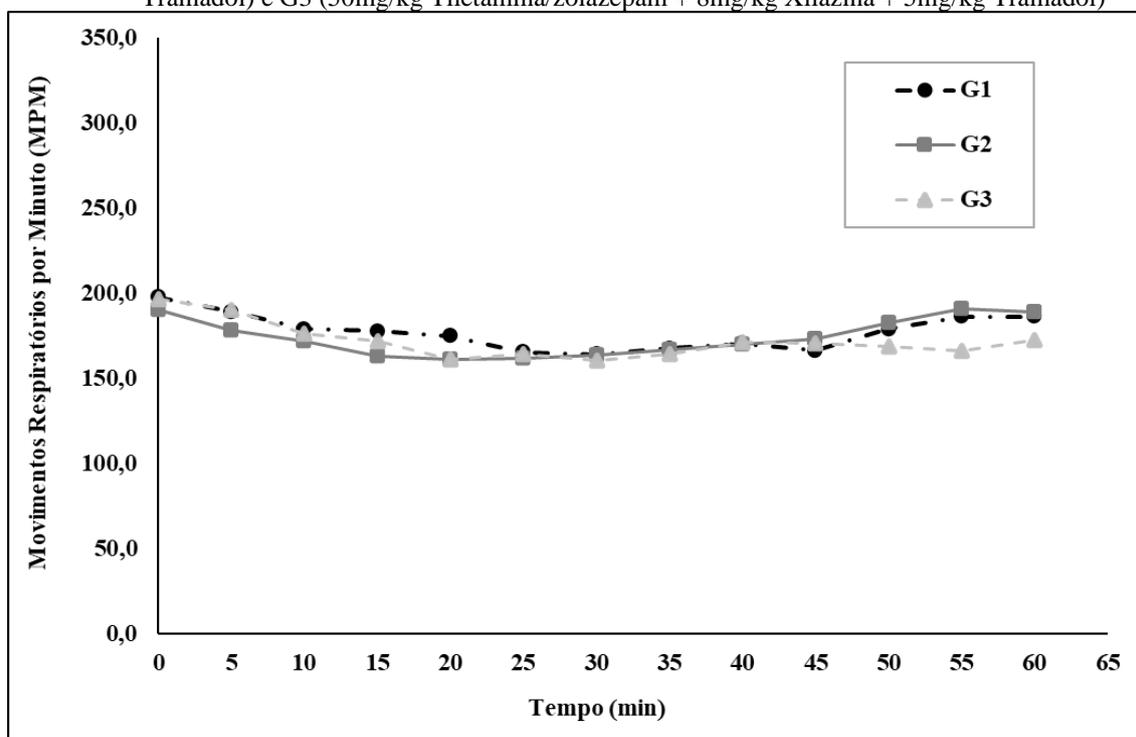
Tabela 2 - Movimentos respiratórios por minuto (MPM) mínimo, máximo, médio e desvio padrão para cada grupo experimental durante o período anestésico

Grupo Experimental	MPM		
	Mínimo	Máximo	Média
G1 (n = 10)	120	>200	177±10
G2 (n = 10)	128	>200	174±11
G3 (n = 10)	88	>200	172±11

Fonte: Pereira (2023).

G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol).

Gráfico 7 - Representação gráfica dos movimentos respiratórios por minuto (MPM). As avaliações foram realizadas a cada 5 minutos durante uma hora dos animais submetidos aos protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol)



Fonte: Pereira (2023).

#### 4.3.3. Temperatura corpórea

Na época do estudo, no D0, a temperatura ambiente variou de 6,6°C a 24,1°C, de acordo com os dados disponibilizados pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMET) para a cidade de São Paulo (estação convencional Aeroporto de Congonhas) (Tabela 3).

Tabela 3 - Temperatura ambiente e umidade relativa registrados na cidade de São Paulo nos momentos D0

Data (D0)	Grupo	Animais	Temperatura (°C)			Umidade relativa (%)
			12:00 (°C)	Mínima (°C)	Máxima (°C)	
20/05/22	G2	01 ao 10	12,2	6,6	16,5	73
22/05/22	G1	12 ao 16	12,7	10,9	20,3	84
27/05/22	G1	17 ao 19	17,9	15,2	24,1	66
27/05/22	G3	21 ao 28	17,9	15,2	24,1	66
18/06/22	G1	20, 31 e 32	17,2	17,2	17,6	82
18/06/22	G3	29 e 30	17,2	17,2	17,6	82

Fonte: INMET (2022).

G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol).

A temperatura média corpórea dos três grupos (mensurado por termômetro digital infravermelho) foi inferior ao fisiológico (mensurada por via retal), que é de 36,0 a 38,0°C (Tabela 4). A temperatura corpórea média dos animais do grupo G3 se manteve significativamente superior à dos animais do grupo G1 e G2 (Gráfico 8).

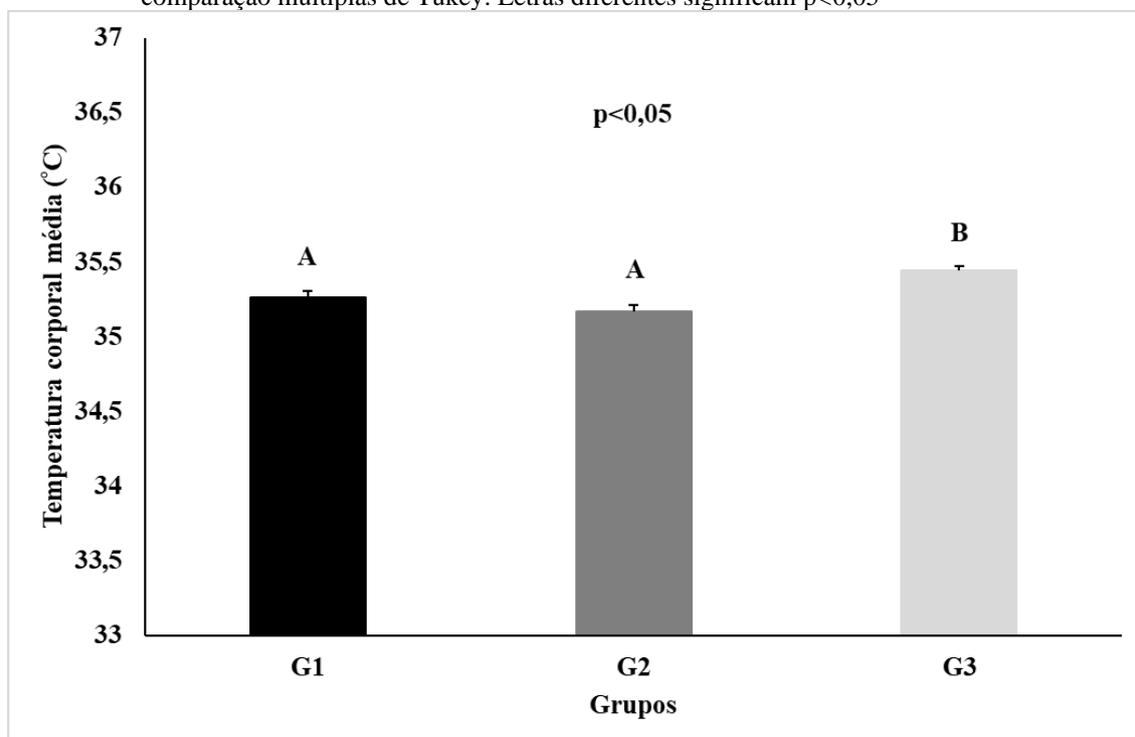
Tabela 4 - Temperatura corpórea (°C) mínima, máxima e média e erro padrão para cada grupo experimental durante o período anestésico. Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey

Grupo Experimental	Temperatura corpórea (°C)		
	Mínimo	Máximo	Média
G1 (n = 10)	33,9	36,7	35,3 ± 0,05 <sup>A</sup>
G2 (n = 10)	33,9	36,2	35,2 ± 0,04 <sup>A</sup>
G3 (n = 10)	34,1	36,6	35,4 ± 0,03 <sup>B</sup>

Fonte: Pereira (2023).

Letras diferentes significam  $p < 0,05$ .

Gráfico 8 - Representação da média e o erro padrão temperatura corporal média em graus celsius (°C). Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey. Letras diferentes significam  $p < 0,05$



Fonte: Pereira (2023).

Letras diferentes significam  $p < 0,05$ .

#### 4.3.4. Ganho de peso no período experimental de dia 0 (D0) ao dia 7 (D+7)

Os dados de peso diário para fêmeas ( $n=5$  animais por grupo) e machos ( $n = 5$  animais por grupo) estão nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. O ganho de peso diário de acordo com o sexo está representado nos Gráficos 9 e 10.

Tabela 5 - Peso médio das fêmeas de acordo com o grupo experimental, no período de dia 0 (D0) ao dia 7 (D+7)

Grupo Experimental	Momento (D)							
	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7
G1 (n = 5)	24,32	24,23*	24,68	25,01	25,33	25,60	25,57*	25,87
G2 (n = 5)	24,88	24,91	25,60	25,89	25,71	26,17	26,30	26,68
G3 (n = 5)	22,40	22,58	22,49*	22,67	23,02	23,45	23,72	24,14

Fonte: Pereira (2023).

G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol); \* momentos em que o peso médio foi inferior ao peso obtido no momento anterior.

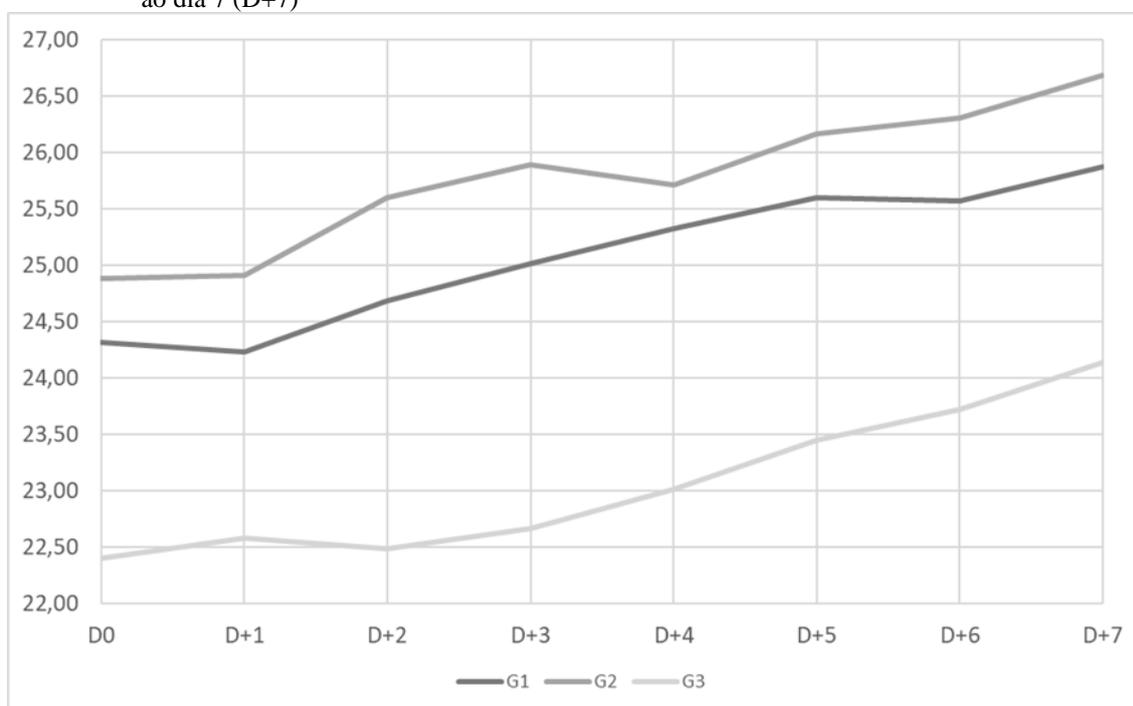
Tabela 6 - Peso médio dos machos de acordo com o grupo experimental, no período de dia 0 (D0) ao dia 7 (D+7)

Grupo Experimental	Momento (D)							
	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7
G1 (n = 5)	25,09	25,36	25,55	25,82	26,27	26,81	27,24	27,84
G2 (n = 5)	28,18	29,66	30,00	30,41	30,34*	30,52	29,77*	30,70
G3 (n = 5)	26,33	26,40	26,96	27,18	27,84	28,32	28,77	29,50

Fonte: Pereira (2023).

G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol); \* momentos em que o peso médio foi inferior ao peso obtido no momento anterior.

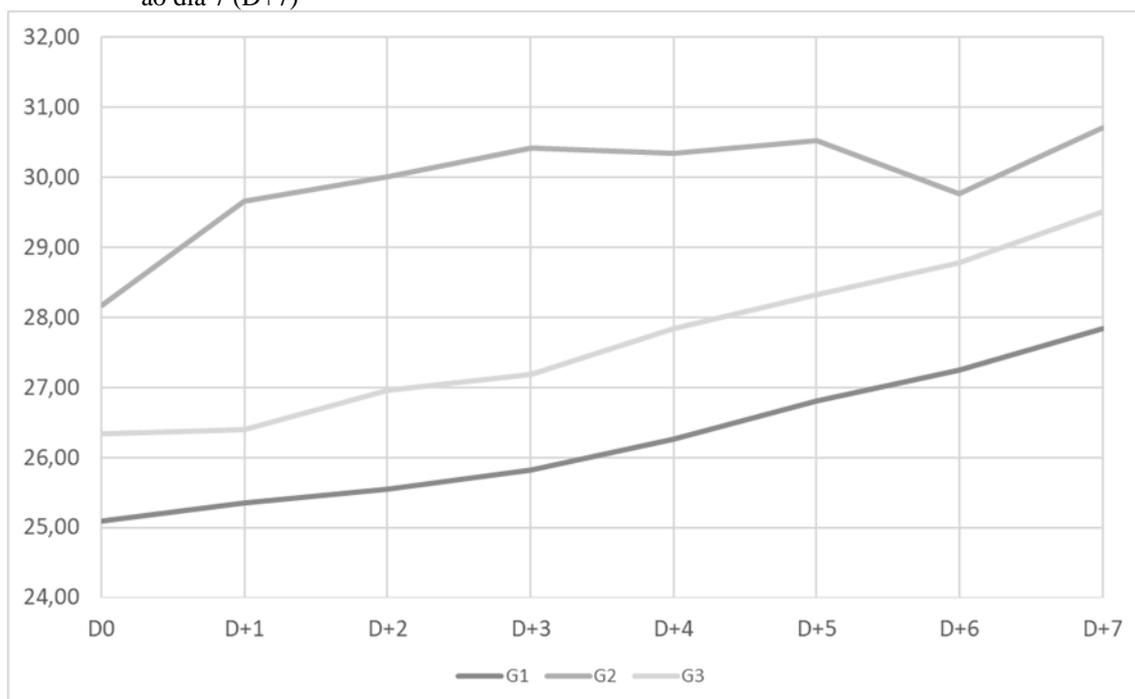
Gráfico 9 - Peso médio diário das fêmeas de acordo com o grupo experimental, no período de dia 0 (D0) ao dia 7 (D+7)



Fonte: Pereira (2023).

G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol).

Gráfico 10 - Peso médio diário dos machos de acordo com o grupo experimental, no período do dia 0 (D0) ao dia 7 (D+7)



Fonte: Pereira (2023).

G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol).

O ganho de peso após sete dias de realização da anestesia de todos os animais foi calculado através da diferença entre o peso obtido no D+7 e o peso inicial (D0) para cada animal. A média dos dados obtidos estão representados na Tabela 7.

Não houve diferença entre os grupos experimentais ao considerar o ganho de peso médio de todos os animais, independente do sexo (Gráfico 11). Entretanto, quando avaliados separadamente, os machos apresentaram ganho de peso significativamente superior às fêmeas (Gráfico 12).

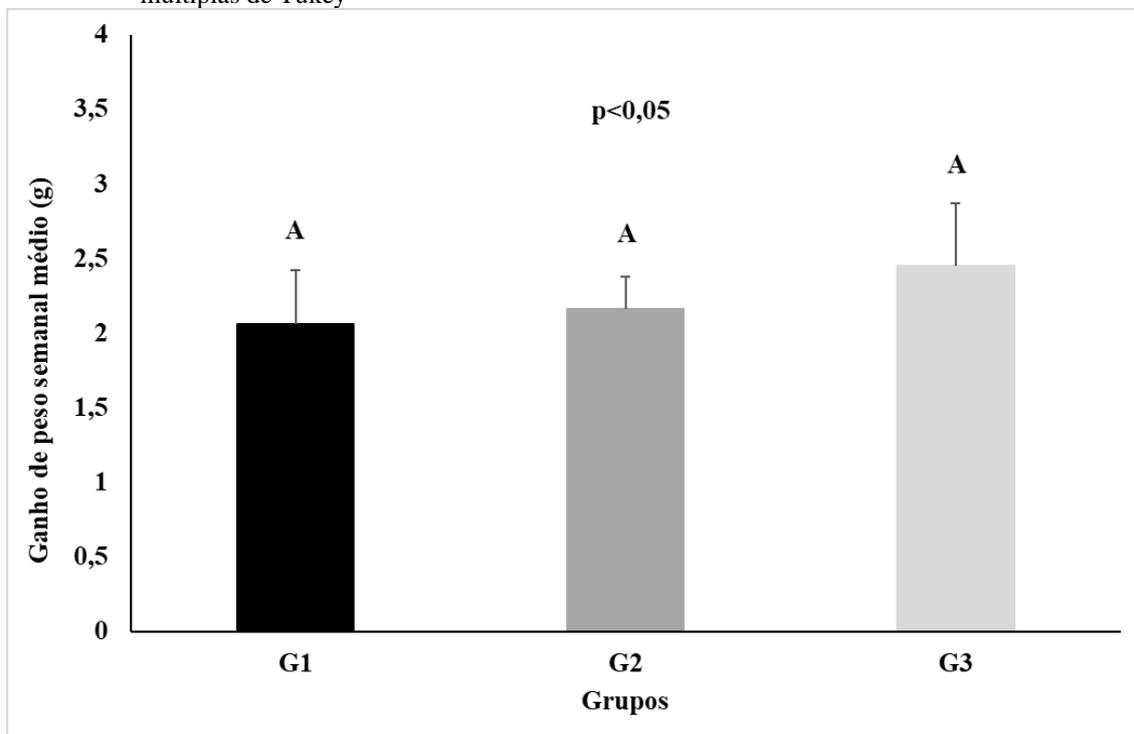
Tabela 7 - Ganho de peso médio (g), após sete dias de realização da anestesia, de acordo com o grupo experimental. Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey

Grupo Experimental	Ganho de peso semanal (g)
G1 (n = 10)	2,06 ± 0,36 <sup>A</sup>
G2 (n = 10)	2,16 ± 0,22 <sup>A</sup>
G3 (n = 10)	2,45 ± 0,41 <sup>A</sup>

Fonte: Pereira (2023).

Letras diferentes significam  $p < 0,05$ .

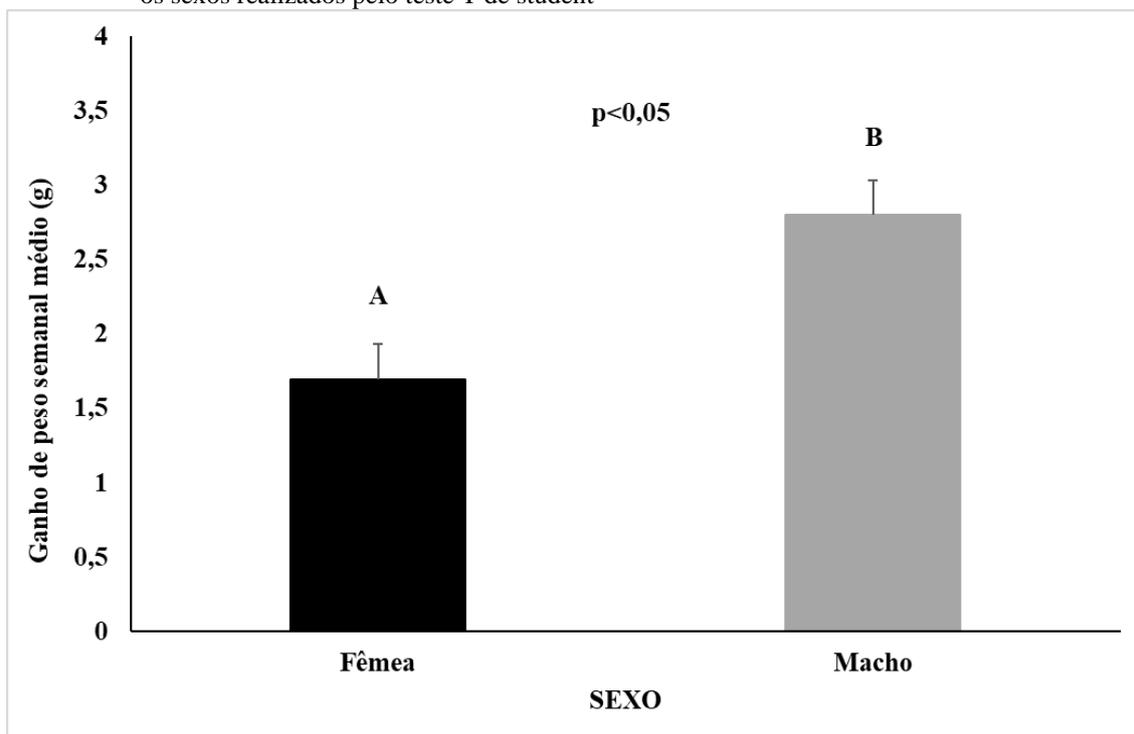
Gráfico 11 - Representação da média e o erro padrão da média do ganho de peso em gramas (g) após sete dias de realização da anestesia de todos os animais (n = 10 animais por grupo). Comparação entre os protocolos anestésicos G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) realizados pela ANOVA de um fator seguido do teste de comparação múltiplas de Tukey



Fonte: Pereira (2023).

Letras diferentes significam  $p < 0,05$ .

Gráfico 12 - Representação da média e o erro padrão da média do ganho de peso em gramas (g) após sete dias de realização da anestesia de todos os animais (n = 5 ♀, 5 ♂ por grupo). Comparação entre os sexos realizados pelo teste T de student



Fonte: Pereira (2023).

Letras diferentes significam  $p < 0,05$ .

#### 4.3.5. Eventos adversos

Os eventos adversos foram observados como presença ou ausência e a cianose foi observada em todos os grupos experimentais (Tabela 8).

No grupo G1 foi observada a mortalidade do animal 17 (macho), em que 10 minutos após a administração do anestésico apresentou dispneia e a mortalidade ocorreu 12 minutos após este evento (22 minutos após a administração). Durante a necropsia não foram observadas alterações macroscópicas (Figura 3).

Tabela 8 - Eventos adversos observados durante o período anestésico de acordo com o grupo experimental

Grupo Experimental	Mortalidade	Sialorreia	Cianose	Vocalização	Outros
G1	10% (1/10)	11% (1/9)	33% (3/9)	11% (1/9)	---
G2	0	0	60% (6/10)	0	Hiperexcitação e pedalagem após a administração (um animal)
G3	0	0	70% (7/10)	0	Hiperexcitação após a administração (um animal)

Fonte: Pereira (2023).

G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol); G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol).

Figura 3 - Necropsia do animal 17 do grupo G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) no momento dia 0 (D0)



Fonte: Pereira (2023).

#### 4.4. DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO 1

Para o grupo G1 (100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), cinco animais (três fêmeas e dois machos) não entraram em plano anestésico de indução, sendo que um dos machos que não entrou em plano anestésico veio a óbito após o procedimento.

No grupo G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol), cinco animais não apresentaram indução, sendo duas fêmeas e três machos. No grupo G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol), não houve indução de um animal (fêmea).

Considerando todos os animais, seis fêmeas e cinco machos não apresentaram sucesso na indução, estudos demonstram que fêmeas sexualmente maduras precisam de uma dose anestésica maior do que os machos, devido a influência hormonal (ARRAS *et al.*, 2001). Neste estudo, os animais estavam na fase final da puberdade (entre 5 e 6 semanas de idade), todavia devido ao pequeno número de animais avaliados, não é possível avaliar se houve interferência do sexo porque o número de animais não induzidos por sexo foi semelhante.

Durante o estudo verificou-se que a maior porcentagem de indução cirúrgica e de anestesia cirúrgica ocorreu no grupo G3 (90%). Além disso, neste grupo também houve o maior tempo total de anestesia, 95,6 minutos, o que foi inferior ao observado por Chen *et al.* (2015), quando realizou a associação de 80mg/kg Tiletamina/zolazepam + 10mg/kg Xilazina + 10mg/kg Tramadol aplicados pela via intraperitoneal e obteve o tempo total de 141 minutos. Os resultados diferiram quanto ao tempo de anestesia cirúrgica, o que no estudo de Chen *et al.* (2015) foi de 87 minutos e no presente estudo foi de 41,5 minutos, possivelmente porque no estudo de Chen *et al.* (2015), as doses utilizadas de tiletamina/zolazepam foram de 80mg/kg, ou seja, 1,6 vezes superiores ao utilizado neste estudo (50mg/kg). O uso de 80 mg/kg de tiletamina/zolazepam sem associação induz uma rápida anestesia, porém sem analgesia para camundongos. Doses superiores a 100 mg/kg de tiletamina/zolazepam induzem a anestesia, não levam a analgesia e causam eventos adversos como dificuldade respiratória e mortalidade (SILVERMAN *et al.*, 1983). O uso do tramadol associado a outros fármacos como tiletamina/zolazepam + xilazina pode explicar os tempos mais longos para o retorno do reflexo postural em comparação com outros protocolos (CHEN *et al.*, 2015). Ainda, estudos realizados apenas com a

associação tiletamina/zolazepam demonstraram que o uso de doses inferiores a 40 mg/kg não leva a anestesia (SILVERMAN *et al.*, 1983).

Resultados semelhantes aos obtidos nos animais dos grupos G1 e G2 em relação aos tempos de indução (de aproximadamente 10 minutos) foram observados por Pessoa (2022), utilizando protocolo de anestesia injetável em camundongos da linhagem *Swiss* com 80mg/kg cetamina + 10mg/kg xilazina. Além disso, foi registrado neste experimento com anestesia dissociativa que alguns animais não conseguiam atingir o plano anestésico, sendo necessário novas aplicações de fármacos com metade da dose inicial. Navarro *et al.* (2021) recomendam que a reaplicação ocorra no momento correto, a fim de evitar mortalidade, o que deve ocorrer enquanto há reflexo podal e deve-se aplicar 50% da dose inicial de cetamina ou 25% da dose inicial de cetamina + xilazina.

Diferentemente, Tsukamoto *et al.* (2015) observaram que todos os animais anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) atingiram o plano de anestesia cirúrgica. As discrepâncias observadas podem ser decorrentes das linhagens distintas dos camundongos utilizados: isogênica ddY no experimento de Tsukamoto *et al.* (2015) e heterogênica *Swiss-Webster* no presente trabalho.

Nos grupos G1 e G2 não houve diferença entre os grupos quanto a indução e anestesia cirúrgica. E os três grupos não apresentaram diferença estatística no tempo de recuperação cirúrgica e todos apresentaram intervalo de recuperação de 10 a 20 minutos, conforme preconizado para protocolos anestésicos para procedimentos de inoculação intracerebral no teste de NIH (BRUCKNER *et al.*, 2003).

Quanto à temperatura corpórea, observou-se hipotermia durante o período anestésico em todos os grupos avaliados, o que era esperado devido ao procedimento de anestesia e porque o tamanho diminuto dos camundongos interfere na manutenção da temperatura corporal (DO CARMO ALONSO *et al.*, 2008). A hipotermia leva a uma menor biotransformação hepática dos fármacos (PESSOA, 2022), sendo que um decréscimo maior ou igual a 2°C da temperatura corpórea já tornam a recuperação significativamente mais lenta (CARO; HANKENSON; MARX, 2013). Assim, é prudente a adoção de medidas para a redução da perda de calor para essa espécie, independentemente do protocolo anestésico utilizado (DO CARMO ALONSO *et al.*, 2008). A hipotermia foi observada em estudo de Do Carmo Alonso *et al.* (2008), quando o protocolo anestésico era composto por tiletamina/zolazepam, todavia neste estudo o grupo G3, que recebeu a tiletamina/zolazepam apresentou temperatura corpórea média de 35,44°C, o que é mais próximo do fisiológico do que os demais grupos.

O uso do termômetro infravermelho permite o monitoramento rápido, sem contato e, portanto, com menor estresse ao animal, que pode ser feito em larga escala, além de ser um equipamento de baixo custo. Embora os valores sejam uma estimativa da temperatura de superfície e não representam fielmente a temperatura do animal, ainda assim é possível o monitoramento (KAWAKAMI; SIELSKI; KAWAKAMI, 2018), sendo a região mediana do corpo a que apresenta maior correlação com a temperatura retal é recomendável que seja padronizado o local de aferição, para minimizar as possibilidades de variação (SAEGUSA; TABATA, 2003). Diferente das probes retais que apenas podem ser utilizadas com os animais anestesiados e que podem causar ferimentos aos animais submetidos a múltiplas aferições (WARN *et al.*, 2003), ou mesmo causar a lesão da mucosa intestinal tornando propício para uma infecção bacteriana (NAVARRO *et al.*, 2021). A temperatura corpórea possui uma correlação direta com a frequência cardíaca e respiratória sendo, portanto, um importante parâmetro de monitoramento do plano anestésico e condição do animal (CARO; HANKENSON; MARX, 2013).

Com relação à frequência respiratória, os valores de referência para um camundongo adulto são de 215 a 230 movimentos respiratórios por minuto (BRAUN *et al.*, 2012).

Houve uma redução em todos os grupos quando comparado ao parâmetro fisiológico. O menor valor foi observado no grupo G3, de 88 MPM. A depressão respiratória é um efeito decorrente da aplicação de anestésicos dissociativos, como a tiletamina e a cetamina (FLECKNELL, 2016) e, portanto esperado, porém os animais retornaram à normalidade após os procedimentos. Quando avaliado o peso diário dos animais, todos os grupos apresentaram um aumento no peso ao longo do período (tanto machos quanto fêmeas), exceto nos momentos: D+1 (G1 – fêmeas), D+2 (G3 – fêmeas), D+4 (G2 – machos) e D+6 (G1 – fêmeas, G2 – machos). Nestes momentos a perda de peso variou de 0,03 g até 0,75 g.

Todas as perdas de peso observadas foram seguidas de um restabelecimento do peso e aumento de peso no momento seguinte, o que demonstra ser um achado pontual, sem impacto na saúde dos animais.

Quanto ao ganho de peso médio, todos os grupos apresentaram aumento do peso e, embora não tenha havido diferença estatística entre eles, o grupo G3 apresentou o maior ganho de peso, sendo inclusive 0,39 g superior ao grupo G1, o qual teve o menor ganho de peso, o que demonstra o bem-estar e a recuperação dos animais deste grupo, mesmo

diante de um tempo total de plano anestésico maior que os demais grupos e com redução dos movimentos respiratórios.

Entre os eventos adversos observados, a cianose foi comum a todos os grupos experimentais, sendo mais frequente no grupo G3, o que pode ser em virtude do longo período anestésico aliado a bradipneia observada neste grupo. Em virtude dessa diminuição na saturação de oxigênio, visando minimizar efeitos depressivos cardiopulmonares dessas associações anestésicas, recomenda-se a suplementação com oxigênio, como preconizado por Chen *et al.* (2015).

A vocalização e a sialorreia foram observadas em apenas uma ocasião no grupo G1. A sialorreia é um achado recorrente quando se administra a cetamina, sendo que estudos descrevem o benefício do uso pré-anestésico da atropina como forma de reduzir esse efeito, sendo que doses de 0,05 mg/kg de atropina previamente à anestesia com 200 mg/kg de cetamina + 15 mg/kg de xilazina foi considerado um plano anestésico seguro, sem mortalidades e eficaz (JAMAL *et al.*, 2019).

Variações de resposta foram relatadas em protocolos cetamina + xilazina, que podem estar relacionados a variabilidade individual, sexo, idade, estado nutricional e metabolismo hepático, além de administração por vias erradas, tais como subcutânea em vez de intraperitoneal (JAMAL *et al.*, 2019).

No grupo G2, um animal apresentou hiperexcitação e pedalagem após a administração dos anestésicos, que foram transitórias de maneira semelhante à hiperexcitação observada em um animal do grupo G3.

No grupo G1 foi observada a mortalidade de um animal, o que pode ter correlação com a dose administrada de xilazina para os animais deste grupo, que foi superior ao utilizado para os animais do grupo G2, em que não houve este evento adverso. Todavia, em estudo realizado por Jamal *et al.* (2019) quando utilizadas as mesmas doses de cetamina e xilazina associadas a administração prévia da atropina, não se observou mortalidade. Ainda, em estudo de Tsukamoto *et al.* (2015) foi observada bradicardia no protocolo anestésico utilizando 100 mg/kg de cetamina + 10 mg/kg de xilazina e que se manteve durante todo o período de avaliação, que foi de 40 minutos após a administração dos anestésicos o que, inclusive foi considerado o principal evento adverso, uma vez que a frequência respiratória e a saturação de oxigênio se mantiveram estáveis. Já no experimento realizado por Pessoa (2022), na análise de três testes de potência do vírus rábico, foi observado mortalidade em nove (7,5%) camundongos da linhagem Swiss em

consequência às reações adversas (hipotermia e depressão cardiorrespiratória) do procedimento anestésico com 80mg/kg de cetamina + 10mg/kg de xilazina.

Os fármacos selecionados para a condução do estudo são acessíveis e com vários fabricantes no mercado, exceto o Zoletil<sup>®</sup>50, que possui um alto custo quando comparado aos demais anestésicos injetáveis utilizados no trabalho, pois enquanto que o custo por mL da associação de cetamina + xilazina + acepromazina + tramadol é de R\$20,88/mL, o protocolo G3 cuja associação de Zoletil<sup>®</sup> + xilazina + tramadol custa R\$47,17/mL portanto, o protocolo G3 é 2,26 vezes mais caro do que o protocolo G1 ou G2. Além disso, o Zoletil<sup>®</sup>50 possui durabilidade de apenas oito dias após a reconstituição quando mantido sob refrigeração e é uma associação medicamentosa, não permitindo a administração de doses diferentes de tiletamina e zolazepam, com o agravante de ser um produto comercializado por apenas uma indústria farmacêutica no Brasil.

A dificuldade de qualquer procedimento anestésico seja o injetável ou inalatório aplicado em larga escala como no teste de NIH será o monitoramento correto dos animais, pois não é possível verificar hipotermia, frequência respiratória individualmente. Em um procedimento em que se anestesia um animal por vez é possível avaliar sinais vitais relacionados a função cardiorrespiratória, tais como frequência cardíaca, frequência respiratória, pressão sanguínea, saturação de oxigênio e temperatura (TSUKAMOTO *et al.*, 2015), possibilitando o uso de equipamentos específicos como oxímetro, monitor de frequência cardíaca, termômetro retal e uma assistência específica como a suplementação de oxigênio durante o plano anestésico cirúrgico.

#### 4.5. CONCLUSÕES DO EXPERIMENTO 1

A partir dos resultados obtidos dos diferentes protocolos anestésicos na primeira etapa é possível concluir que:

- Os animais do grupo G3 (combinação de 50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) apresentaram menor necessidade de reaplicação de volume anestésico.
- Foi encontrada em uma porcentagem maior de animais (90%) pertencentes ao grupo G3 com sucesso na indução anestésica.
- O tempo de anestesia cirúrgica durou mais tempo (95,6 minutos) para os camundongos do grupo G3.
- Os métodos anestésicos utilizados nos animais dos grupos G2 (combinação de 100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol) e G3 demonstraram ser seguros com ausência de mortalidade.
- Em todos os grupos houve ganho de peso após sete dias de realização da anestesia, o que demonstra a recuperação após o procedimento anestésico
- O protocolo anestésico do Grupo G3 foi selecionado para a segunda etapa, pois atende aos critérios de segurança, eficácia e tempo de anestesia cirúrgica definidos no experimento.

## 5. EXPERIMENTO 2

**Comparativo entre protocolo anestésico injetável G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) e inalatório G4 (1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção)**

### 5.1. INTRODUÇÃO

Nesta etapa foram comparados dois protocolos anestésicos em camundongos: 1) protocolo injetável selecionado na primeira etapa, denominado G3 II (combinação de 50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol); 2) protocolo inalatório G4 (1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção), o qual já foi estabelecido para a rotina do Instituto Pasteur nos procedimentos de inoculação intracerebral.

## 5.2. MATERIAIS E MÉTODOS DO EXPERIMENTO 2

### 5.2.1. Delineamento experimental

Na segunda etapa do trabalho foram utilizados 42 camundongos (21 ♀ e 21 ♂) heterogênicos da linhagem *Swiss Webster* com cinco semanas de idade provenientes da colônia do Biotério do Instituto Pasteur. Os animais foram distribuídos em grupos experimentais conforme descrito no Quadro 4.

Quadro 4 - Protocolo anestésico de acordo com o grupo experimental

Grupo	Número de animais	Xilazina (mg/kg)	Acepromazina (mg/kg)	Tramadol (mg/kg)	Tiletamina + zolazepam (mg/kg)	Isoflurano (1mL/mL)
G3 II	10♂ + 11♀	8	---	5	50	---
G4	11♂ + 10♀	---	1	5	---	Indução a 5% - 0,5 L/min e manutenção a 2,5% a 0,5 L/min

Fonte: Pereira (2023).

### 5.2.2. Administração

Nesta etapa foram utilizados os anestésicos dos mesmos fabricantes utilizados na etapa anterior e o isoflurano 100% (Isoforine - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA).

Os fármacos injetáveis foram diluídos no momento do uso e o excedente descartado após a utilização.

Os critérios de diluição e administração para o grupo G3 II foi o mesmo utilizado na primeira etapa do trabalho (Experimento 1 - item 4.2.2).

A administração foi realizada com agulha 13 x 0,45 mm acoplada a seringa de 1 mL com subdivisões a cada 0,02 mL, sendo utilizada uma seringa e agulha por animal.

Dado que a concentração fornecida de cada anestésico por animal é pequena, então optou-se por realizar a diluição de cada fármaco, de modo que a solução final contendo todos os anestésicos não ultrapassou 250 µL para um animal de 25g.

Para isso, os fármacos injetáveis foram diluídos em solução fisiológica NaCl 0,9% e acondicionados no mesmo frasco para o fornecimento de uma dose única. O critério de arredondamento de volume aplicado para cada animal foi o ajuste para o volume acima, de acordo com a graduação da seringa (APÊNDICE B).

As soluções anestésicas foram administradas pela via intraperitoneal para os animais do grupo G3 II da mesma forma que realizada na primeira etapa para o grupo G3 (Experimento 1).

Para o grupo G4 foram utilizados maleato de acepromazina 2mg/mL (Apromazin 0,2% injetável – Syntec do Brasil LTDA), cloridrato de tramadol 50 mg/mL (Tramal 50mg injetável - Laboratórios Pfizer LTDA).

A solução anestésica foi administrada pela via intraperitoneal para os animais do grupo G4, sendo Acepromazina (2 mg/mL) e Tramadol (50 mg/mL) diluídos nas proporções 1:4 e 1:20, respectivamente. Após 10 a 15 minutos da aplicação foi realizada a indução da anestesia com isoflurano através do sistema de anestesia inalatória digital de baixo fluxo por infusão para camundongos (Bonther Produtos e Equipamentos para Laboratório LTDA). A indução foi realizada com isoflurano a 5%, oxigênio a 21% (oxigênio ambiente) e fluxo de 0,5 L/minuto até a observação de perda de reflexos. A partir desse momento foi administrada a taxa de manutenção com isoflurano a 2,5%.

### **5.2.3. Desafio pela via intracerebral**

No momento D0, quando os animais atingiram o plano cirúrgico, foi inoculada a estirpe fixa do RABV *Challenge Virus Standard* CVS/31, procedente do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. Foram feitas diluições seriadas ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ ), inoculadas em grupos de sete animais por diluição de cada grupo experimental. Os camundongos foram observados diariamente quanto a manifestação de sinais clínicos compatíveis com a raiva, a fim de ao término do período realizar a titulação do vírus por meio do cálculo de Reed e Muench (1938).

### **5.2.4. Seleção dos animais**

A seleção dos animais ocorreu no momento D0. Apenas foram incluídos no experimento os animais que atenderam aos critérios de inclusão (item 5.2.5).

### **5.2.5. Critérios de inclusão**

Foram incluídos apenas camundongos heterogênicos da linhagem *Swiss Webster* provenientes da mesma origem (Biotério do Instituto Pasteur), saudáveis, com 5 semanas de idade, com peso de 20 a 32 g.

### **5.2.6. Critérios de exclusão**

Não foram incluídos camundongos de diferentes origens, que não estivessem saudáveis ou que não estivessem com 5 semanas de idade ou que não estivessem com peso de 20 a 32 g.

### **5.2.7. Aclimação**

Não houve necessidade de aclimação, pois os animais permaneceram no mesmo ambiente desde o desmame.

### **5.2.8. Identificação**

Os mini-isoladores dos animais foram identificados de acordo com o grupo experimental e diluição do vírus rábico inoculado.

### **5.2.9. Destino dos animais**

Ao término do experimento todos os animais foram submetidos à eutanásia. As carcaças foram autoclavadas e descartadas conforme procedimento interno do Instituto Pasteur.

### **5.2.10. Eutanásia**

Os animais foram submetidos à eutanásia através de overdose de CO<sub>2</sub> em câmara apropriada.

### **5.2.11. Alojamento**

Os camundongos foram divididos de acordo com o grupo experimental e sexo, sendo alocados de um a três animais em cada em cada mini-isolador de 21,5 cm de largura x 31,6 cm de comprimento x 20,7 cm de altura (679,4 cm<sup>2</sup>, 226 cm<sup>2</sup>/animal).

Os mini-isoladores foram mantidos em racks ventiladas com pressão negativa (Rack ventilada ALN para camundongos – Alesco<sup>®</sup>) e forradas com maravalha, que eram substituídas uma vez por semana.

A temperatura ambiente foi controlada entre 22 e 26°C e umidade relativa de 40 a 60%. O fotoperíodo foi de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água autoclavada disponibilizada em bebedouros com bico e ração irradiada apropriada para a espécie NUVILAB CR-1 (Quimtia SA) durante todo o período experimental.

### **5.2.12. Cuidados durante o período anestésico**

O ambiente foi mantido aquecido durante todo o período pré-anestésico até o momento da recuperação da anestesia através do uso de aquecedor a óleo sob a mesa cirúrgica onde foi realizada o procedimento e através do aquecimento do ar ambiente com o uso de aparelho de ar-condicionado ajustado entre 25 e 27°C.

Foi aplicada pomada ocular lubrificante carbômer 2 mg/g (Vidisic<sup>®</sup> Gel – Bausch+Lomb) após a sedação de modo a prevenir o ressecamento ocular.

### **5.2.13. Parâmetros avaliados**

#### **5.2.13.1. Tempo gasto na atividade**

Para estimar o tempo gasto na atividade foram consideradas as etapas: pesagem e administração do anestésico pela via intraperitoneal (G3 II e G4), inoculação intracerebral (G3 II), anestesia inalatória e inoculação intracerebral (G4) e acompanhamento da recuperação dos animais após o término do procedimento de inoculação intracerebral em todos os animais do grupo (G3 II e G4).

Os procedimentos de administração anestésica, pesagem e inoculação intracerebral foram realizados em duas pessoas. Apenas o acompanhamento da recuperação dos animais foi realizado por uma pessoa.

#### 5.2.13.2. Custo

Os custos foram estimados baseados em pelo menos três cotações para cada item através de pesquisa na internet cotados em reais e convertidos em dólares de acordo com a cotação média do dólar para o mês de setembro de 2022 (1 dólar americano = 5,236 real brasileiro) (IPEA, 2022). Não foram considerados os custos de equipamentos comuns aos dois grupos, tais como: rack ventilada, cabine de segurança biológica e balança.

Além disso, foi estimado o custo de mão de obra, de acordo com a remuneração de cargos públicos para as funções de Médico veterinário e Técnico de biotério (editais de concurso de 2018 a 2021). Para todas as atividades considerou-se um Médico veterinário e um Técnico de biotério, exceto para o acompanhamento da recuperação da anestesia, em que se considerou apenas um técnico de biotério.

#### 5.2.13.3. Título viral

Cada grupo experimental era composto por 21 animais, subdivididos em três grupos de sete animais cada, de acordo com a diluição do vírus inoculado. Os animais foram avaliados diariamente quanto à presença de sinais clínicos compatíveis com a raiva por 14 dias. Aos sinais clínicos foram atribuídos os escores descritos no Quadro 5, baseado no procedimento realizado pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) e descrito por Bruckner *et al.* (2003); Servat e Cliquet (2015).

Quadro 5 - Classificação de sinais clínicos em camundongos da linhagem *Swiss Webster* compatíveis com raiva avaliados no período do dia 0 (D0) ao dia 14 (D+14) pós-inoculação com vírus fixo CVS/31

Símbolo	Sinais clínicos
	Saudável, sem alterações compatíveis com a raiva
D	Doente: encurvamento, pelos arrepiados, movimentos lentos ou circulares, tremores e convulsões (estágios 1, 2 e 3)
PA	Paralítico: paresia ou paralisia
PS	Prostrado: prostrado, moribundo, não consegue se alimentar
M	Morto

Fonte: Adaptado de Bruckner *et al.* (2003).

Para o cálculo de Reed e Muench foram considerados os dados coletados no último dia de leitura (D+14), assim os animais que apresentaram os sinais clínicos compatíveis com raiva (D, PA, PS) foram classificados como 1 (presença), enquanto que os animais que permaneceram saudáveis ( | ) ou morreram sem sinais prévios de raiva foram classificados como 0 (ausência).

As Fórmulas 1 e 2 foram utilizadas para os cálculos do título viral:

$$Fórmula 1 = \frac{50\% - (mortalidade\ abaixo\ de\ 50\%)}{(mortalidade\ acima\ de\ 50\%) - (mortalidade\ abaixo\ de\ 50\%)}$$

$$Fórmula 2 = (diluição\ cuja\ mortalidade\ foi\ abaixo\ de\ 50\%) + (resultado\ da\ Fórmula\ 1 \times fator\ de\ diluição)$$

### 5.3. RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2

#### 5.3.1. Tempo gasto na atividade

O tempo gasto para o desempenho de cada uma das atividades está descrito na Tabela 9.

Tabela 9 - Tempo gasto para a realização da anestesia, inoculação intracerebral e acompanhamento da recuperação de 21 animais por grupo de G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) e G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção)

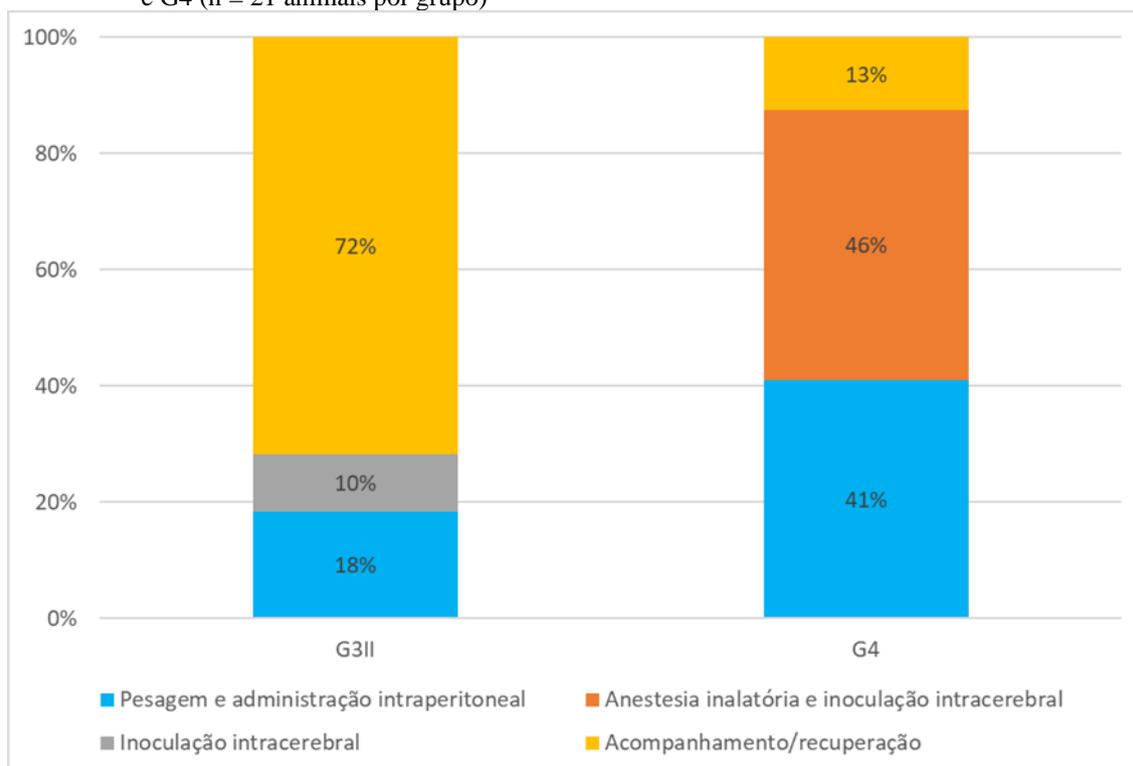
Tempo por atividade (min)	Grupo experimental	
	G3 II (n=21)	G4 (n=21)
Pesagem e administração intraperitoneal	30	23
Anestesia inalatória e inoculação intracerebral	Não se aplica	26
Inoculação intracerebral	16	Não se aplica
Acompanhamento/recuperação	117	7
Tempo total	163	56

Fonte: Pereira (2023).

O tempo total gasto foi de 163 minutos e 56 minutos para os grupos G3II e G4, respectivamente. Para efeitos comparativos entre os grupos serão considerados apenas as etapas de pesagem, anestesia e inoculação intracerebral, uma vez que estas atividades são afetadas diretamente pelo número de animais inoculados, diferentemente da etapa de acompanhamento/recuperação, a qual é pouco influenciada pelo número de animais, já que o técnico consegue acompanhar vários animais ao mesmo tempo, sem tanta variação de tempo. Desta forma, o tempo despendido por animal foi de 2,19 minutos e 2,33 minutos para os grupos G3 II e G4, respectivamente.

Considerando as proporções de tempo gasto para cada atividade nos grupos, para o Grupo G3 II a maior parte do tempo foi para a realização do acompanhamento dos animais em recuperação após o término do procedimento (72%), enquanto que no grupo G4, houve praticamente um equilíbrio entre o tempo gasto realizando a pesagem + administração intraperitoneal (41%) e a anestesia inalatória + inoculação intracerebral (46%) (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Porcentagem de tempo gasto para realização de cada etapa do procedimento nos grupos G3 II e G4 (n = 21 animais por grupo)



Fonte: Pereira (2023).

G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) e G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção).

### 5.3.2. Custo

As estimativas de custo dos insumos e mão de obra estão nas Tabelas 10 e Tabela 11, respectivamente.

Considerando insumos e mão de obra, o custo total para a realização do procedimento em 21 animais seria de R\$110,41 (US\$ 21.09, média da cotação do dólar em setembro de 2022) para o grupo G3 II e R\$124,79 (US\$ 23.83, média da cotação do dólar em setembro de 2022) para o grupo G4.

Tabela 10 - Cálculos de custo de insumo para a realização do procedimento de pesagem, anestesia e inoculação intracerebral para os grupos experimentais G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) e G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção)

Item	G3 II (n=21)		G4 (n=21)	
	Quantidade	Valor (R\$)	Quantidade	Valor (R\$)
	Custo médio			
Seringa de 1mL com agulha acoplada 13 x 0,45 mm	21 unidades	7,77	21 unidades	7,77
Seringa para insulina com agulha ultra fine II BD (volume 0,3mL, 8 mm) - 30 UI	3 unidades	7,50	3 unidades	7,50
Solução fisiológica (NaCl 0,9%)	2,4 mL	0,14	1,8 mL	0,11
Maleato de acepromazina 0,2%	---	---	0,3 mL	1,13
Tramadol	0,1 mL	1,10	0,1 mL	1,10
Xilazina 2%	0,2 mL	0,45	---	---
Zoletil 50	0,5 mL	16,98	---	---
Isoflurano 100%	---	---	15,0 mL	51,90
Total (R\$) *		33,94		69,51
Total (US\$) **		6,48		13,28

Fonte: Pereira (2023).

\*Cotação realizada em setembro de 2022. \*\*Cotação do dólar comercial para compra em setembro de 2022 (IPEA): 1US\$ = R\$5,236.

Tabela 11 - Cálculo de custo de mão de obra para a realização do procedimento de pesagem, anestesia e inoculação intracerebral para os grupos experimentais G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) e G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção)

Grupo experimental	Atividade	Tempo (min)	
		Médico veterinário (MV)*	Técnico de biotério (TB)**
G3 II (n=21)	Pesagem e anestesia intraperitoneal	30	30
	Inoculação intracerebral	16	16
	Acompanhamento/recuperação	---	117
Total (R\$)		40,20	36,27
Total (US\$)		7.68	6.93
G4 (n=21)	Pesagem e anestesia intraperitoneal	23	23
	Anestesia inalatória e inoculação intracerebral	26	26
	Acompanhamento/recuperação	---	7
Total (R\$)		42,82	12,46
Total (US\$) ***		8.18	2.38

Fonte: Pereira (2023).

\*Salário médio de R\$52,43/hora; \*\* Salário médio de R\$13,35/hora; \*\*\* Cotação do dólar comercial para compra em setembro de 2022 (IPEA): 1US\$ = R\$5,236.

Considerando que para a realização do teste de NIH de uma vacina são utilizados 168 animais, o que equivale a oito vezes mais animais do que foi utilizado neste trabalho, a estimativa de custo dos insumos foi multiplicada por 8, totalizando R\$271,52 para o grupo G3 II e R\$556,08 para o grupo G4 (Tabela 12). Para cálculo do custo de mão de obra considerou-se multiplicar por 8 o custo da mão de obra do médico veterinário (MV) e do técnico de biotério (TB) para as atividades de pesagem, anestesia e inoculação intracerebral, desta forma o custo foi de R\$403,48 (R\$ 321,60 MV + R\$ 81,88 TB) para o grupo G3 II e R\$429,78 (R\$ 342,56 MV + R\$ 87,22 TB) para o grupo G4. Para o custo de mão de obra do técnico de biotério no acompanhamento da recuperação dos animais, manteve-se os custos calculados para os 21 animais, ou seja, R\$26,03 e R\$1,56 para os grupos G3 II e G4, respectivamente. Desta forma, para o teste de NIH, o custo do procedimento anestésico seria de R\$701,03 (US\$ 133.88, cotação média do dólar em setembro de 2022) em 8 horas e 5 minutos de trabalho para o grupo G3 II e R\$987,42 (US\$ 188.58, cotação média do dólar em setembro de 2022) em 6 horas e 39 minutos de trabalho para o grupo G4 (Tabela 12).

Tabela 12 - Cálculo do custo do procedimento anestésico para o teste de NIH considerando os protocolos dos grupos G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) e G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção)

Item	Custo (R\$ e US\$)*	
	G3 II (n=168)	G4 (n=168)
Insumos	R\$ 271,52 (US\$ 51.86)	R\$ 556,08 (US\$ 106.20)
Mão de obra do médico veterinário	R\$ 321,60 (US\$ 61.42)	R\$ 342,56 (US\$ 65.42)
Mão de obra do técnico de biotério	R\$ 107,91 (US\$ 20.61)	R\$ 88,78 (US\$ 16.95)
<b>Total</b>	<b>R\$ 701,03 (US\$ 133.88)</b>	<b>R\$ 987,42 (US\$ 188.58)</b>

Fonte: Pereira (2023).

\* Cotação do dólar comercial para compra em setembro de 2022 (IPEA): 1US\$ = R\$5,236.

Na Tabela 13 constam os custos dos equipamentos de anestesia inalatória próprios para camundongos, sendo os valores referentes às cotações realizadas em setembro de 2022.

Tabela 13 - Custos de equipamentos de anestesia inalatória para camundongos

Fabricante	Modelo	Custo (R\$)*	Custo (U\$)**
Bonther Produtos e Equipamentos para Laboratório LTDA	Sistema de anestesia inalatória digital de baixo fluxo por infusão para camundongos	16.000,00	3,055.76
Kent Scientific Corporation	Somnsouite low-flow anesthesia system + kit de acessórios para camundongos	67.306,01	12,854.47
Kent Scientific Corporation	Somnoflo-low-flow electronic vaporizer + kit de acessórios para camundongos	71.597,30	13,674.04

Fonte: Pereira (2023).

\*Cotação realizada em setembro de 2022. \*\*Cotação do dólar comercial para compra em setembro de 2022 (IPEA): 1US\$ = R\$5,236.

### 5.3.3. Título viral

Os resultados da titulação da estirpe fixa do RABV CVS/31 estão na Tabela 14, sendo que foi utilizada a mortalidade observada até o 14º dia após a inoculação para realização do cálculo. Não houve mortalidade por inoculação e todas as mortalidades

foram precedidas de sinais clínicos compatíveis com raiva. Os títulos obtidos foram semelhantes entre os grupos.

Tabela 14 - Titulação do vírus fixo CVS/31 nos grupos G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) e G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção)

Diluição do vírus	Mortos	
	G3 II	G4
10 <sup>-6</sup>	4/7	7/7
10 <sup>-7</sup>	3/7	3/7
10 <sup>-8</sup>	0/7	2/7
Título (LOG DL <sub>50</sub> /mL)	6,50	7,15

Fonte: Pereira (2023).

Os cálculos realizados estão descritos nas Tabelas 15 e Tabela 16.

Tabela 15 - Cálculo do título viral em LOG DL<sub>50</sub>/mL utilizando o método de Reed e Muench (1938) para o grupo G3 II (n = 7 animais por diluição)

Diluição	Quantidade de camundongos		Total acumulado		Mortalidade
	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes	Mortos	
10 <sup>-6</sup>	3	4	3	7	7/10 (70%)
10 <sup>-7</sup>	4	3	7	3	3/10 (30%)
10 <sup>-8</sup>	7	0	14	0	0/14 (0%)

Fonte: Pereira (2023).

Tabela 16 - Cálculo do título viral em LOG DL<sub>50</sub>/mL utilizando o método de Reed e Muench (1938) para o grupo G 4 (n = 7 animais por diluição)

Diluição	Nº de camundongos		Total acumulado		Mortalidade
	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes	Mortos	
10 <sup>-6</sup>	0	7	0	12	12/12 (100%)
10 <sup>-7</sup>	4	3	4	5	5/9 (55,5%)
10 <sup>-8</sup>	5	2	9	2	2/11 (18,2%)

Fonte: Pereira (2023).

#### 5.4. DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO 2

O uso de protocolos anestésicos em animais de laboratório utilizados em pesquisa é crescente e aperfeiçoado, à medida que a humanidade evolui e se conscientiza da importância do refinamento das técnicas utilizadas, o que se desenvolveu principalmente nos séculos XX e XXI, sendo inclusive as técnicas anestésicas consideradas fundamentais para a evolução da experimentação. E atualmente ocorre o aperfeiçoamento das técnicas e treinamento das equipes (CLUTTON, 2020).

Ainda é carente o detalhamento dos protocolos anestésicos utilizados para os diversos procedimentos realizados em animais de laboratório nos artigos científicos publicados (CICERO *et al.*, 2018; UHLIG *et al.*, 2015).

A implantação dos protocolos anestésicos em testes de controle de qualidade de vacinas, como o NIH, é imprescindível para a adequação à legislação, devido ao grau de invasividade considerado grave, tanto pelo procedimento de inoculação intracerebral (com consequente aumento da pressão intracraniana) quanto pelos sinais clínicos progressivos decorrentes da infecção pelo vírus fixo da raiva (Resolução nº 55 do CONCEA de 05 de outubro de 2022). Como a inoculação intracerebral em camundongos é considerada um procedimento extremamente invasivo e doloroso, é recomendável por autoridades reguladoras, tais como o Ministério da Agricultura dos EUA [*United States Department of Agriculture (USDA)*], a incorporação dos protocolos de anestesia geral/analgesia nos testes de potência para vacinas antirrábicas humanas e veterinárias (USDA, 2012).

Em eventos internacionais destinados aos maiores especialistas de raiva do mundo, foram discutidos métodos alternativos nos testes de vacinas antirrábicas de uso humano e animal. Os participantes desses encontros, que usavam na rotina a anestesia injetável ou inalatória previamente à inoculação intracerebral, declararam que não houve impactos negativos nos resultados, sendo fortemente recomendado o uso para minimizar a dor e o distresse inerentes ao procedimento e considerado um “refinamento” dos testes de NIH em camundongos (BRUCKNER *et al.*, 2003; STOKES *et al.*, 2012).

O procedimento que antes era realizado em um determinado tempo, sem anestesia, precisará ser realizado em um tempo maior devido ao uso dos anestésicos. Possivelmente para isso além dos recursos financeiros, serão necessários ajustes como o número de testes realizados em um dia, possivelmente será reduzido, ou será necessário o aumento da equipe dedicada à realização dos testes.

Considerando que as instituições que realizam os testes de controle de qualidade de vacinas, como o NIH, costumam testar mais de uma vacina por dia, considerando que a carga horária de trabalho é geralmente de 8 horas por dia, então uma equipe de duas pessoas só conseguiria realizar o teste de uma vacina por dia, independente do uso do protocolo do grupo G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) ou G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção).

Ainda, é importante avaliar como será composta a equipe para otimizar o tempo e, principalmente, aplicar o vírus fixo CVS no menor intervalo possível em todos os grupos em teste, para garantir que não haja redução do título do vírus. Caso não seja possível, deve-se considerar a preparação de uma amostra que seja subdividida em alíquotas e mantida estocada sob refrigeração e periodicamente substituída a alíquota que está em uso.

O teste realizado com anestesia inalatória (G4) foi mais rápido quando comparado à anestesia injetável, principalmente pelo tempo dispensado no acompanhamento da recuperação dos animais, que foi a atividade que consumiu mais tempo na realização do protocolo G3 II (Tabela 9). A brevidade na indução e na recuperação dos anestésicos inalatórios é a vantagem primordial em comparação ao protocolo injetável (CESAROVIC *et al.*, 2010). Adicionalmente, como os anestésicos inalatórios apresentam efeitos cardiodepressivos menos severos em relação aos agentes injetáveis, são considerados extremamente seguros, devido a um maior controle do plano anestésico (CONSTANTINIDES; MEAN; JANSSEN, 2011).

Por outro lado, o protocolo injetável (G3II) foi uma opção porque imaginou-se que seria possível anestésiar vários animais ao mesmo tempo, o que em um aparelho de anestesia inalatória não seria possível, além do menor custo (1,4 vezes menos, quando considerado apenas os insumos e a mão de obra, conforme Tabela 12). Pelas desvantagens demonstradas no presente trabalho, evidenciadas principalmente no maior tempo de execução (quase 3 vezes mais que a anestesia inalatória, conforme Tabela 9) e maiores cuidados requeridos no acompanhamento e recuperação dos animais do protocolo G3II, tornam o estabelecimento do protocolo injetável a ser avaliado. He *et al.* (2010) reconhecem as vantagens da associação injetável cetamina/xilazina/acepromazina (65 mg/kg Cetamina, + 13 mg/kg Xilazina + 1,5 mg/kg Acepromazina) em comparação com anestesia com isoflurano em cirurgias de transplante de fígado em ratos e camundongos, tais como menor custo pois dispensa o uso de equipamentos específicos, maior segurança

ao operador (ausência de exposição aos gases utilizados na anestesia inalatória) e maior facilidade no procedimento.

Para a implantação dos protocolos nos laboratórios deve-se avaliar a equipe necessária, no caso do uso do protocolo injetável (G3 II) é recomendável a avaliação de estruturação de mais de uma equipe, por exemplo, duas equipes, cada uma com um técnico de biotério e um veterinário, que poderiam realizar os procedimentos de anestesia, pesagem e inoculação simultaneamente. Caso não seja possível uma equipe de quatro pessoas, é recomendável que seja constituída pelo menos de três pessoas, um técnico de biotério que realizaria a pesagem e inoculação do anestésico pela via intraperitoneal enquanto o outro técnico de biotério e o veterinário realizam a inoculação intracerebral. Como o tempo de anestesia cirúrgica dos animais anestesiados pela via injetável é maior então é recomendável que no caso da escolha dessa via de anestesia se considere fazer o procedimento logo no início da jornada de trabalho, pois assim haverá tempo suficiente para acompanhar a recuperação dos animais.

A composição de equipes para trabalhar simultaneamente não seria possível para o protocolo anestésico inalatório, pois não seria financeiramente viável a aquisição de mais de um equipamento de anestesia inalatória, porém se poderia avaliar a composição de uma equipe de três pessoas, de modo semelhante ao citado para o protocolo anestésico injetável.

Os tempos obtidos nesse estudo, tratam-se de uma referência para laboratórios que desejam implantar o protocolo anestésico injetável ou inalatório, mas é possível que com a prática e a implantação na rotina, os tempos sejam otimizados. Para os operadores que não estão adaptados ao uso do equipamento de anestesia inalatória é necessário um treinamento específico até a adaptação para realização da inoculação intracerebral com o animal no equipamento de anestesia. Mesmo assim, com a prática esta atividade se tornaria mais fácil, uma vez que o animal está anestesiado.

Considerando que haja a intenção em adquirir o equipamento de anestesia inalatória enquanto se conduz os testes com o uso do protocolo anestésico injetável, então ao término de 56 testes de NIH utilizando o protocolo anestésico injetável, será economizado R\$ 16.037,84<sup>1</sup> em comparação ao uso do teste utilizando anestesia inalatória, o que seria suficiente para adquirir o equipamento de anestesia inalatória da fabricante Bonther (Tabelas 12 e 13).

Quanto aos títulos do vírus fixo CVS/31, os resultados foram próximos para os dois grupos experimentais, demonstrando que não houve interferência do protocolo

---

<sup>1</sup> (R\$987,42\*56) – (R\$701,03\*56) = R\$55.295,52 – R\$39.257,68 = R\$16.037,84

anestésico sobre os sinais clínicos, estando de acordo com a Resolução Normativa nº 57 do CONCEA de 06 de dezembro de 2022, referente aos procedimentos em roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Títulos virais ligeiramente menores foram observados nos animais do grupo G3 II em comparação aos do grupo G4 (Tabela 14). Os diferentes fármacos utilizados nesses grupos não apresentam atividades antivirais descritas na literatura, diferentemente da cetamina (que em altas concentrações *in vitro*, 1-2 mM = 230 a 470 mg) apresenta atividade de inibição da replicação do vírus da raiva *in vitro* e *in vivo* (JOCHMANS; NEYTS, 2019; LOCKHART; TORDO; TSIANG, 1992).

Embora o teste de NIH seja o teste padrão para as vacinas antirrábicas de uso veterinário, de modo semelhante ao que ocorre para avaliação da eficácia de vacinas de uso humano, há a tendência mundial de redução do número de animais ou mesmo da substituição por métodos alternativos. Já é reconhecido pela Farmacopeia Europeia, a técnica desenvolvida por Krämer *et al.* (2010, 2013) para avaliação da potência das vacinas antirrábicas de uso veterinário. em que cada vacina teste utiliza 40 animais subdivididos em quatro grupos de 10 animais cada, de acordo com a diluição da vacina recebida. Após 14 dias da vacinação, é realizada a coleta de sangue para obtenção do soro sanguíneo e com este material é realizado o teste de RFFIT com modificações. As vantagens do teste envolvem o menor uso de animais, o não desafio com o vírus rábico, menor tempo de teste e menos variável que o teste de NIH.

Há um longo caminho para que esse teste se torne padrão em substituição ao NIH, pois ainda são necessários testes desta técnica com as vacinas produzidas no Brasil e posteriormente a realização de testes comparativos entre a nova metodologia e o teste de NIH, o que será uma etapa complexa e laboriosa, uma vez que o próprio teste de NIH apresenta resultados variáveis de baixa reprodutibilidade.

Uma vez implantada no Brasil as técnicas de “refinamento” propostos no presente trabalho, com adoção de protocolos anestésicos injetáveis e/ou inalatórios, será um grande avanço tanto para o bem-estar animal, padronização dos testes de NIH e mesmo redução de custos, pois seriam necessários menos animais e conseqüentemente seria possível realizar mais testes de eficácia ou mesmo reduzir o tamanho do biotério de experimentação. Adicionalmente, associadas a essas técnicas propostas, poder-se-iam adotar protocolos de avaliação de resposta imune *in vitro* vacinal, permitindo um acompanhamento mais próximo dos animais e o melhor de tudo, sem a etapa de desafio com o vírus da raiva, o que acabaria de vez com o sofrimento dos animais, com instalações

de biotério em um nível de biossegurança mais baixo, minimizando o risco do operador, dispensando assim a vacinação antirrábica humana e sorologia de acompanhamento.

## 5.5. CONCLUSÕES DO EXPERIMENTO 2

Com os resultados obtidos neste estudo é possível concluir que:

- O protocolo anestésico injetável G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) demanda mais tempo para realização do que o protocolo inalatório G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção), principalmente pela necessidade de acompanhamento até a recuperação anestésica.
- O protocolo anestésico injetável (G3 II) apresenta menor custo de insumos, equipamentos e de mão de obra quando comparado ao protocolo inalatório (G4)
- Ambos os protocolos não influenciaram no resultado do título do vírus rábico (CVS/31).

## 6. CONCLUSÕES FINAIS

Pelos resultados dos experimentos realizados, pode-se concluir:

O protocolo injetável G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol) demonstrou desempenho similar (em relação eficácia e segurança) ao obtido com anestesia inalatória G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção). Ambos são aplicáveis para utilização em muitos animais, previamente à inoculação intracerebral realizada no teste de NIH.

Cada protocolo apresenta suas particularidades, sendo G3 uma opção econômica quanto a custos de mão de obra, insumos e equipamentos e que demanda maior tempo de acompanhamento na recuperação anestésica. Enquanto a anestesia inalatória G4 é mais onerosa, mas que necessita menor tempo no acompanhamento da recuperação.

## 7. REFERÊNCIAS

- AHMADI-NOORBAKHSI, S. *et al.* Anesthesia and analgesia for common research models of adult mice. **Laboratory Animal Research**, v. 38, n.40, p. 1–16, 2022.
- ALY, N. I.; ELNAKER, Y. F.; SALAMA, Z. T. S.; DIAB, M. S.; SABER, E. A.; SOTOHY, S. A.; ELFEIL, W. K.; KHODEIR, M. H. Preparation and the assessed efficacy of oral baits for the vaccination of free-roaming dogs against rabies. **Veterinary World**, v. 15, n.5, p. 1383–1390, 2022.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. de. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. 1. ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.
- ARAUJO, F. R. C.; PAIXÃO, R. L. Humane endpoint in mice by Brazilian researchers in the vaccine sector. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 500–508, 2019.
- ARRAS, M.; AUTENRIED, P.; RETTICH, A.; SPAENI, D.; RÜLICHE, T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. **Comparative Medicine**, v. 51, n. 5, p. 443–456, Out. 2001.
- AUER, R. N. Effect of age and sex on N-Methyl-D-Aspartate antagonist-induced neuronal necrosis in rats. **Stroke**, v. 27, n. 4, p. 743–746, Abr. 1996.
- BARTH, R.; DIDERRICH, G.; WEINMANN, E. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. **Vaccine**, v.6, n.4, p. 369-377, 1988.
- BASTOS, V.; MOTA, R.; GUIMARÃES, M.; RICHARD, Y.; LIMA, A. L.; CASSEB, A.; BARATA, G. C.; ANDRADE, J.; CASSEB, L. M. N. Challenges of rabies surveillance in the Eastern Amazon: the need of a one health approach to predict rabies spillover. **Frontiers in Public Health**, v. 9, p. 1–10, 2021.
- BEERY, A. K. Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 23, p. 143–149, 2018.
- BELL, J. F.; MOORE, G. J. Effects of high ambient temperature on various stages of rabies virus infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 10, n. 3, p. 510–515, Set. 1974.
- BESHAH, E. **Evaluation of potency and immunogenicity of inactivated cell culture rabies vaccine, prepared at National Veterinary Institute, Ethiopia**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - College of Veterinary Medicine and Agriculture, Addis Ababa University, Bishoftu, 2018.
- BONITO, R. F.; DE OLIVEIRA, N. M.; NISHIOKA, S. D. A. Adverse reactions associated with a Fuenzalida-Palacios rabies vaccine: a quasi-experimental study. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 1, p. 7–9, jan./fev.2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Cobertura vacinal de cães e gatos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/r/raiva/cobertura-vacinal-de-caes-e-gatos>>. Acesso em: 6 jan. 2023.

BRASIL, Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Nota técnica 01 - IP/CCD/SES-SP Revisada - 24/11/2020 - Vacinação antirrábica canina e felina 2020. 2020.

BRASIL. Coordenadoria de Planejamento de Saúde. **Deliberação CIB nº 169 de 15 de dezembro de 2021**. Brasil. 2021. Disponível em: <[https://ses.sp.bvs.br/wp-content/uploads/2021/12/E\\_DL-CIB-169\\_151221.pdf](https://ses.sp.bvs.br/wp-content/uploads/2021/12/E_DL-CIB-169_151221.pdf)>. Acesso em: 07 jan. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros**. Brasília: MAPA, 2009. 125 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n. 228, de 25 de outubro de 1988**.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 2: roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Brasília, DF, 2019.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução n. 55 de 5 de outubro de 2022. Atualiza o texto da Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica – DBCA. 2022a.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução n. 57, de 6 de dezembro de 2022. Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação de roedores e lagomorfos mantidos em instalações de ensino ou pesquisa científica. 2022b.

BRAUN, A.; ERNST, H.; SCHAUDIEN, D.; HOYMAN, H.G.; RITTINGHAUSEN, S. The respiratory system. *In*: HEDRICH, H. J. (ed.). **The Laboratory Mouse**. 2. ed. Italy: Elsevier, 2012. p. 271–312.

BRUCKNER, L.; CUSSLER, K.; HALDER, M.; BARRAT, J.; CASTLE, P.; DUCHOW, K.; GATEWOOD, D. M.; GIBERT, R.; GROEN, J.; KNAPP, B.; LEVIS, R.; MILNE, C.; PARKER, S.; STUNKEL, K.; VISSER, N.; VOLKERS, P. Three Rs approaches in the quality control of inactivated rabies vaccines. **Atla**, v. 31, p. 429–454, 2003.

BRUNSON, D. B. Pharmacology of inhalation anesthetics. *In*: FISH, R.E.; BROWN, M.J.; DANNEMAN, P.J.; KARAS, A. Z. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. 2. ed. [s.l.] Academic Press, 2008. p. 83–96.

BURKHOLDER, T.; FOLTZ, C.; KARLSSON, E.; LINTON, C. G.; SMITH, J. M. Health evaluation of experimental laboratory mice. **Current Protocol Mouse Biology**, v. 2, p. 145–165, 2012.

CAGLE, L. A.; FRANZI, L. M.; EPSTEIN, S. E.; KASS, P. H.; LAST, J. A.; KENYON, N. J. Injectable anesthesia for mice: combined effects of dexmedetomidine, tiletamine-zolazepam, and butorphanol. **Anesthesiology Research and Practice**, v. 2017, p. 1–7, 2017.

CAIT, J.; CAIT, A.; SCOTT, R. W.; WINDER, C. B.; MASON, G. J. Conventional laboratory housing increases morbidity and mortality in research rodents: results of a meta-analysis. **BMC Biology**, v. 20, n. 15, p. 1–22, 2022.

CALIFORNIA DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH. Permissible exposure limits for chemical contaminants. 2021. Disponível em: <[https://www.dir.ca.gov/title8/5155table\\_ac1.html](https://www.dir.ca.gov/title8/5155table_ac1.html)>. Acesso em: 20 de janeiro de 2023.

CARO, A. C.; HANKENSON, F. C.; MARX, J. O. Comparison of thermoregulatory devices used during anesthesia of C57BL / 6 mice and correlations between body temperature and physiologic parameters. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 52, n. 5, p. 577–583, 2013.

CASTILHO, J. G.; IAMAMOTO, K.; LIMA, J. Y.O.; SCHEFFER, K. C.; CARNIELI JUNIOR, P.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; ACHKAR, S. M.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 47, p. 12–18, 2007.

CESAROVIC, N.; NICHOLLS, F.; RETTICH, A.; KRONEN, P.; HÄSSIG, M.; JIRKOF, P.; ARRAS, M. Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice. **Laboratory Animals**, v. 44, n. 4, p. 329–336, 2010.

CFR. § 113.209 Rabies Vaccine, Killed Virus. Disponível em: <<https://www.law.cornell.edu/cfr/text/9/113.209>>. Acesso em: 8 jan. 2023.

CHABAUD-RIOU, M.; MORENO, N.; GUINCHARD, F.; NICOLAI, M. C.; NIOGRET-SIOHAN, E.; SÈVE, N.; MANIN, C.; GUINET-MORLOT, F.; RIOU, P. G-protein based ELISA as a potency test for rabies vaccines. **Biologicals**, v. 46, p. 124–129, 2017.

CHEN, L.; YIN, Y.P.; WU, C.C.; JIANG, S.; FAN, H.G.; LU, D. Anesthesia with intraperitoneal tiletamine / zolazepam, xylazine, and tramadol in mice. v. 71, n. 4, p. 219–223, 2015.

CICERO, L.; FAZZOTTA, S.; PALUMBO, V. D.; CASSATA, G.; LO MONTE, A. I. Anesthesia protocols in laboratory animals used for scientific purposes. **Acta Biomedica**, v. 89, n. 3, p. 337–342, 2018.

CLUTTON, R. E. An anglocentric history of anaesthetics and analgesics in the refinement of animal experiments. **Animals**, v. 10, n. 1933, p. 1–22, 2020.

CONCEIÇÃO, J.F.S.; PEREIRA, G.B.A.; SANTOS, A.S.; MORI, C.M.C.; NOGI, K.I.; FERREIRA, K.C.S.; FAHL, W.O.; MORI, E.; ASANO, K.M. Establishing an anesthetic protocol for refinement of intracerebral inoculation procedure. **Biological Models Research and Technology**, v. 2, p. e00192021, 2022.

CONSTANTINIDES, C.; MEAN, R.; JANSSEN, B. J. Effects of isoflurane anesthesia on the cardiovascular function of the C57BL/6 mouse. **ILAR journal**, v. 52, n. 3, p. 1-20, 2011.

CORONA, T. F.; BÖGER, B.; ROCHA, T. C.; SVOBODA, W. K.; GOMES, E. C. Comparative analysis of mouse inoculation test and virus isolation in cell culture for rabies diagnosis in animals of Parana, Brazil. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 51, n. 1, p. 39–43, 2018.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; AGUIAR, T. D. F.; ROLIM, B. N.; ROMIJN, P. C.; ROCHA, M. F. G. Rabies virus viability after short-term cryopreservation using cryoprotectant agents. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 106–112, 2011.

DAS, R. G.; NORTH, D. Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures. **Laboratory Animals**, v. 41, p. 312–320, 2007.

DO CARMO ALONSO, D.; POMPERMAYER, L. G.; PEREIRA, T.; ZEYMER, F. V.; LANG, A.; MATA, L. B. S. C. Tiletamina-zolazepam e levomepromazina como anestésico em camundongos (*Mus musculus*). **Ceres**, v. 55, n. 4, p. 265–269, 2008.

EUROPEAN COMMISSION, **EudraLex Volume 4 Annex 5: manufacture of immunological veterinary**, v. 11, p.55-64, 2014.

FAO. **Vaccine manual: the production and quality control of veterinary vaccines for use in developing countries**. 1. ed. Roma: FAO, 1997.

FAWCETT, A. **ARRP Guideline 22: guidelines for the housing of mice in scientific institutions**. Animal Welfare unit. 2012.

FDA. Investigating out-of-specification (OOS) test results for pharmaceutical production guidance for industry. 1 ed., 2022. 17 p.

FLECKNELL, P. **Laboratory Animal Anaesthesia**. 4. ed. United States of America: Academic Press, 2016. 321 p.

FLEISCHMANN, T.; JIRKOF, P.; HENKE, J.; ARRAS, M.; CESAROVIC, N. Injection anaesthesia with fentanyl-midazolam-medetomidine in adult female mice: importance of antagonization and perioperative care. **Laboratory Animals**, v. 50, n. 4, p. 264–274, 2016.

GONÇALVES, N. S.; SOARES, P. S.; SANTOS, D. C. O panorama epidemiológico da raiva humana no Brasil com foco na região sul do país. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 8, n. 3, p. 268–275, 2018.

HE, S.; ATKINSON, C.; QIAO, F.; CHEN, X.; TOMLINSON, S. Ketamine – Xylazine – Acepromazine compared with isoflurane for anesthesia during liver transplantation in rodents. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 1, p. 45–51, 2010.

HENDRIKSEN, C. F. M.; STEEN, B. Refinement of vaccine potency testing with the use of humane endpoints. **ILAR Journal**, v. 41, n. 2, p. 105–113, 2000.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus taxonomy**: 2021 release. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>>. Acesso em: 7 jan. 2023.

JAMAL, M. A.; AHMED, A. M.; TAHIR, M.; ASHRAF, M.; SATTAR, A.; GHAFOR, A.; MUNIR, S.; AHMED, I.; HUSSAIN, M.; RIAZ, A. Safety and efficacy of ketamine xylazine along with atropine anesthesia in BALB/c mice. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, p. 1–6, 2019.

JOCHMANS, D.; NEYTS, J. The path towards effective antivirals against rabies. **Vaccine**, v. 37, n. 33, p. 4660–4662, 2019.

KAPLAN, MARTIN M; KOPROWSKI, H. **La rabia**. 3. ed. Geneva: Organización Mundial de la Salud, 1976. 389 p.

KAWAHARA, M.; TAKAYAMA-ITO, M.; KATO, H.; KITAURA, S.; SATOH, M.; SAIJO, M. Development of an assay for detecting the residual viable virus in inactivated rabies vaccine by enzyme-linked immunosorbent assay. **Biologicals**, v. 70, p. 59–63, 2021.

KAWAI, S.; TAKAGI, Y.; KANEKO, S.; KUROSAWA, T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. **Experimental Animals**, v. 60, n. 5, p. 481–487, 2011.

KAWAKAMI, Y.; SIELSKI, R.; KAWAKAMI, T. Mouse body temperature measurement using infrared thermometer during passive systemic anaphylaxis and food allergy evaluation. **Journal of Visualized Experiments**, n. 139, p. 1–6, 2018.

KHALIL, W. M.; ABOSHANAB, K. M.; ABOWLWafa, M. M. Evaluation and correlation of rabies vaccine potency using the National Institute of Health, Rapid Focus Fluorescent Inhibition, and Passive Hemagglutination Tests. **Viral Immunology**, v. 35, n. 2, p. 159–169, 2022.

KRÄMER, B.; BRUCKNER, L.; DAAS, A.; MILNE, C. Collaborative study for validation of a serological potency assay for rabies vaccine (inactivated) for veterinary use. **Pharmeuropa Bio & Scientific Notes**, v. 2010, n. 2, p. 37–55, out. 2010.

KRÄMER, B.; KAMPHUIS, E.; HANSCHMANN, K. M.; MILNE, C.; DAAS, A.; DUCHOW, K. A multi-dose serological assay suitable to quantify the potency of inactivated rabies vaccines for veterinary use. **Biologicals**, v. 41, n. 6, p. 400–406, 2013.

KUMAR, K. A.; VISHAL GUPTA, N. Handling of out of specification results. **International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance**, v. 6, n. 2, p. 38–44, 2015.

KUMAR, S.; SINGH, M. P.; BHARTI, V. K.; PANDEY, R. P. Quality control of vaccines-A journey from classical approach to 3Rs. **Microbiology: Current Research**, v. 02, n. 03, p. 45–61, 2018.

LANG, C.; KOLAJ-ROBIN, O.; CIREFICE, G.; TACONET, L.; PEL, E.; JOUETTE, S.; BUDA, M.; MILNE, C.; CHARTON, E. Replacement, Reduction, Refinement - Animal welfare progress in European Pharmacopoeia monographs: activities of the European Pharmacopoeia Commission from 2007 to 2017. **Pharmeuropa Bio & Scientific Notes**, v. 2018, p. 12–36, 2018.

LAWSON, K. F.; CRAWLEY, J. F. The ERA strain of rabies vaccine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 36, n. 4, p. 339–344, 1972.

LIN, H. C.; THURMON, J. C.; BENSON, G. J.; TRANQUILLI, W. J. Review: Telazol – a review of its pharmacology and use in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, n. 4, p. 383–418, 1993.

LOCKHART, B. P.; TORDO, N.; TSIANG, H. Inhibition of rabies virus transcription in rat cortical neurons with the dissociative anesthetic ketamine. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 8, p. 1750–1755, 1992.

LOCKWOOD, L. L.; SILBERT, L. H.; LAUDENSLAGER, M. L.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Anesthesia-induced modulation of *in vivo* antibody levels: A study of pentobarbital, chloral hydrate, methoxyflurane, halothane, and ketamine/xylazine. **Anesthesia and Analgesia**, v. 77, n. 4, p. 769–774, 1993.

MAJEROWICZ, J. **Boas práticas em biotérios e biossegurança**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.

MAJEROWICZ, J. **Procedimentos de biossegurança para as novas instalações do laboratório de experimentação animal (Laean) de Bio-Manguinhos**. 2005. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

MAKI, J.; GUIOT, A. L.; AUBERT, M.; BROCHIER, B.; CLIQUET, F.; HANLON, C. A.; KING, R.; OERTLI, E. H.; RUPPRECHT, C. E.; SCHUMACHER, C.; SLATE, D.; YAKOBSON, B.; WOHLERS, A.; LANKAU, E. W. Oral vaccination of wildlife using a vaccinia-rabies-glycoprotein recombinant virus vaccine (RABORAL V-RG®): A global review. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 1–26, 2017.

MASSOTE, H. **Laboratório de Vacinas Virais do INCQS participa de estudo internacional para avaliação de método alternativo ao uso de animais em vacinas**

**antirrábicas.** Disponível em:

<[https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2580:estudo-internacional-para-avaliacao-de-metodo-alternativo-ao-uso-de-animais-em-vacinas-antirrabicas&catid=42&Itemid=132](https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=2580:estudo-internacional-para-avaliacao-de-metodo-alternativo-ao-uso-de-animais-em-vacinas-antirrabicas&catid=42&Itemid=132)>. Acesso em: 18 jan. 2023.

MEYER, R.E.; FISH, R. E. Pharmacology of injectable anesthetics, sedatives, and tranquilizers. *In*: FISH, R.E.; BROWN, M.J.; DANNEMAN, P.J.; KARAS, A. Z. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. 2. ed. [s.l.] Academic Press, 2008. p. 27 – 82.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Raiva. *In*: MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde**. 3. ed. Brasília: Editora MS, 2019. p. 626–651.

MOREIRA, W. C.; FREITAS, J. F. S.; MACHADO, N. S.; ALMEIDA, A. E. C. C.; MOURA, W. C. de. Development and pre-validation of a quantitative multi-dose serological assay for potency testing of inactivated rabies vaccines for human use. **Journal of Virological Methods**, v. 263, p. 54–59, 2019.

MOREIRA, W. C.; MACHADO, N. S.; FREITAS, J. F. S.; ALMEIDA, A. E. C. C.; MOURA, W. C. de. Testes de potência alternativos para controle da qualidade de imunobiológicos: revisão crítica de abordagens de validação. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 8, n. 1, p. 48–61, 2020.

MORI, E. Raiva. *In*: FOCACCIA, R.; SICILIANO, R. F. **Tratado de infectologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu LTDA, 2020. p. 937–964.

NAVARRO, K. L.; HUSS, M.; SMITH, J. C.; SHARP, P.; MARX, J. O.; PACHARINSAK, C. Mouse Anesthesia: The Art and Science. **ILAR Journal**, v. 62, n. 1–2, p. 238–273, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Rabies**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>>. Acesso em: 6 jan. 2023.

PARK, Y.; KANG, H.; MIN, K.; KIM, N. H.; PARK, M.; OUH, I. O.; KIM, H. H.; SONG, J. Y.; YANG, D. K.; SOHN, E. J.; LEE, S. Rabies virus glycoprotein produced in *Nicotiana benthamiana* is an immunogenic antigen in mice. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 57, n. 1, p. 26–35, 2021.

PERRIN, S. Preclinical research: make mouse studies work. **Nature**, v. 507, n.7493, p. 423–425, mar. 2014.

PESSOA, V. de S. **Estudo comparativo entre anestesia dissociativa e anestesia inalatória para inoculação intracerebral em camundongos**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotérios) - Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.

RIBEIRO, J.; STAUDACHER, C.; MARTINS, C. M.; ULLMANN, L. S.; FERREIRA, F.; ARAUJO JÚNIOR, J. P.; BIONDO, A. W. Bat rabies surveillance and risk factors for rabies spillover in an urban area of Southern Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2018.

RODRIGUES, A. C.; MARCUSSO, R. M. N.; SOUZA, D. N.; FAHL, W. O.; CAPORALE, G. M. M.; MACEDO, C. I.; CASTILHO, J. G. A comparative study of direct fluorescent antibody, mouse inoculation, and tissue culture infection testing for rabies diagnoses. **Journal of Virological Methods**, v. 300, p. 1–7, 2022.

RUPPRECHT, C.E.; FOOKS, A.R.; ABELA-RIDER, B. **Laboratory techniques in rabies**. 5.ed. Genebra: WHO, 2018. v. 1

SAEGUSA, Y.; TABATA, H. Usefulness of infrared thermometry in determining body temperature in mice. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 12, p. 1365–1367, 2003.

SCHIFFELERS, M.J.; BLAAUBOER, B.; BAKKER, W.; HENDRIKSEN, C. Replacing the NIH test for rabies vaccine potency testing: A synopsis of drivers and barriers. **Biologicals**, v. 42, n. 4, p. 205–217, 2014.

SCHWEDLER, M.; MILETICH, D. J.; ALBRECHT, R. F. Cerebral blood flow and metabolism following ketamine administration. **Canadian anaesthetists society journal**, v. 29, n. 3, p. 222–226, 1982.

SERVAT, A.; CLIQUET, F. Mouse Potency Testing of Rabies Vaccines. *In*: RUPPRECHT, C.; NAGARAJAN, T. **Current laboratory techniques in rabies diagnosis, research and prevention**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p.269-279.

SERVAT, A.; KEMPF, S.; LABADIE, A.; SCHEREFFER, J. L.; BOUÉ, F.; CLIQUET, F. In vivo potency tests of rabies inactivated vaccines for veterinary use. A 2-year retrospective analysis of data according to the criteria of the European Pharmacopoeia. **Pharmaceutica bio & scientific notes**, v.20, n.4, p. 655–664, 2008.

SIGOILLOT-CLAUDE, C.; BATTAGLIO, M.; FIORUCCI, M.; GILLET, D.; VIMORT, A. S.; GIRAUD, Y.; LAURENT, S.; VAGANAY, A.; POULET, H. A versatile *in vitro* ELISA test for quantification and quality testing of infectious, inactivated and formulated rabies virus used in veterinary monovalent or combination vaccine. **Vaccine**, v. 33, n. 32, p. 3843–3849, 2015.

SILVA, J. R. F. **Avaliação sanitária do biotério de criação**: uma contribuição para a melhoria da qualidade dos animais de laboratório produzidos no CPqAM. 2013. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

SILVA, R.A.; PASSOS, J. J. Acidente de vacinação anti-rábica com o uso de vacina Flury (vírus de baixa passagem), em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 55–63, 1966.

SILVERMAN, JERALD; HUHNDORF, MARY; BALK, MELVIN; SLATER, G. Evaluation of a combination of tiletamine and zolazepam as an anesthetic for laboratory rodents. **Laboratory Animal Science**, v. 33, n. 5, p. 457–460, 1983.

SMITH, W. Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. **Laboratory Animals**, v. 27, n. 1, p. 30–39, 1993.

SOUSA, A. M.; ASHMAWI, H. A. O efeito analgésico de tramadol não é mediado por receptores opioides na dor de ratos no pós-operatório imediato. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 65, n. 3, p. 186–190, 2015.

STOKES, W.; MCFARLAND, R.; KULPA-EDDY, J.; GATEWOOD, D.; LEVIS, R.; HALDER, M.; PULLE, G.; KOJIMA, H.; CASEY, W.; GAYDAMAKA, A.; RINCKEL, L.; JONES, B. Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward. **Biologicals**, v. 40, n. 5, p. 369–381, 2012.

THEIL, J. H.; AHLOY-DALLAIRE, J.; WEBER, E. M.; GASKILL, B. N.; PRITCHETT-CORNING, K. R.; FELT, S. A.; GARNER, J. P. The epidemiology of fighting in group-housed laboratory mice. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

TOINON, A.; MORENO, N.; CHAUSSE, H.; MAS, E.; NICOLAI, M. C.; GUINCHARD, F.; JAUDINAUD, I.; GUINET-MORLOT, F.; RIOU, P.; MANIN, C. Potency test to discriminate between differentially over-inactivated rabies vaccines: Agreement between the NIH assay and a G-protein based ELISA. **Biologicals**, v. 60, p. 49–54, 2019.

TSUKAMOTO, A.; SERIZAWA, K.; SATO, R.; YAMAZAKI, J.; INOMATA, T. Vital signs monitoring during injectable and inhalant anesthesia in mice. **Exp. Anim**, v. 64, n. 1, p. 57–64, 2015.

UHLIG, C.; KRAUSE, H.; KOCH, T.; DE ABREU, M. G.; SPIETH, P. M. Anesthesia and monitoring in small laboratory mammals used in anesthesiology, respiratory and critical care research: A systematic review on the current reporting in top-10 impact factor ranked journals. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–22, 2015.

UNIT FOR LABORATORY ANIMAL MEDICINE. **Guidelines on Anesthesia and Analgesia in Mice**. 2022 Disponível em: <<https://az.research.umich.edu/animalcare/guidelines/guidelines-anesthesia-and-analgesia-mice>>. Acesso em: 4 fev. 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Guia de anestesia e analgesia para ratos e camundongos**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/creal/informacoes/anestesia\\_FINAL\\_2016.pdf](http://www.ufrgs.br/creal/informacoes/anestesia_FINAL_2016.pdf)>. Acesso em: 07 jan. 2023.

USDA. Center for veterinary biologics notice n.12-12. Use of humane endpoints and methods in animal testing of biological products. 2012. Disponível em: [https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/vet\\_biologics/publications/notice\\_12\\_12.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/notice_12_12.pdf) Acesso em: 8 jan. 2023.

USDA. **Oral rabies vaccination**. Disponível em:

<[https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/wildlifedamage/programs/nrmp/ct\\_orv\\_vaccination](https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/wildlifedamage/programs/nrmp/ct_orv_vaccination)>. Acesso em: 7 jan. 2023.

WALLACE, R. M.; BLANTON, J. Epidemiology. *In*: FOOKS, A. R.; JACKSON, A. C. **Rabies**. 4. ed. United Kingdom: Academic Press, 2020. p. 103–142.

WARN, P. A.; BRAMPTON, M. W.; SHARP, A.; MORRISSEY, G.; STEEL, N.; DENNING, D. W.; PRIEST, T. Infrared body temperature measurement of mice as an early predictor of death in experimental fungal infections. **Laboratory Animals**, v. 37, n. 2, p. 126–131, 2003.

WUNDERLI, P. S.; DREESEN, D. W.; MILLER, T. J.; BAER, G. M. Effects of vaccine route and dosage on protection from rabies after intracerebral challenge in mice. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 4, p. 491–498, 2003.

WUNNER, W.H.; CONZELMANN, K. K. Rabies Virus. *In*: FOOKS, A.; JACKSON, A. **Rabies**. 4. ed. United Kingdom: Academic Press, 2020. p. 43–81.

YANG, D.-K.; KIM, H.-H.; LEE, K.-W.; SONG, J.-Y. The present and future of rabies vaccine in animals. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 2, p. 19–25, 2013.

YANG, X. P.; LIU, Y. H.; RHALEB, N. E.; KURIHARA, N.; KIM, H. E.; CARRETERO, O. A. Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 277, n.5, p.1967-1974, 1999.

## APÊNDICE A - VOLUME DE SOLUÇÃO ANESTÉSICA ADMINISTRADA AOS GRUPOS EXPERIMENTAIS – EXPERIMENTO 1

Tabela 17 - Volume de solução anestésica administrada para o grupo G1(100mg/kg Cetamina + 10mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol)

Identificação do Animal	Identificação do mini-isolador	Sexo	Peso no D0 (g)	Solução anestésica (mL)	
				Calculada	Administrada
12	5	F	24,0	0,192	0,20
13	5	F	27,0	0,216	0,22
15	6	F	24,0	0,192	0,20
31	2	F	23,0	0,184	0,20
32	2	F	22,0	0,176	0,18
16	7	M	26,0	0,208	0,22
17	11	M	24,0	0,192	0,20
18	12	M	25,0	0,200	0,20
19	12	M	23,0	0,184	0,20
20	3	M	25,0	0,200	0,20

Fonte: Pereira (2023).

Tabela 18 - Volume de solução anestésica administrada para o grupo G2 (100mg/kg Cetamina + 8mg/kg Xilazina + 1mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol)

Identificação do Animal	Identificação do mini-isolador	Sexo	Peso no D0 (g)	Solução anestésica (mL)	
				Calculada	Administrada
1	1	F	25,0	0,200	0,20
2	1	F	26,0	0,208	0,22
3	1	F	25,0	0,200	0,20
4	2	F	25,0	0,200	0,20
5	2	F	23,6	0,189	0,20
6	3	M	25,2	0,202	0,22
7	3	M	28,5	0,228	0,24
8	4	M	30,0	0,240	0,24
9	4	M	28,5	0,228	0,24
10	4	M	28,2	0,226	0,24

Fonte: Pereira (2023).

Tabela 19 - Volume de solução anestésica administrada para o grupo G3 (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol)

Identificação do Animal	Identificação do mini-isolador	Sexo	Peso no D0 (g)	Solução anestésica (mL)	
				Calculada	Administrada
26	10	F	22,0	0,132	0,14
27	10	F	23,0	0,138	0,14
28	10	F	20,0	0,120	0,12
29	1	F	22,0	0,132	0,14
30	1	F	23,0	0,138	0,14
21	8	M	27,0	0,162	0,18
22	8	M	26,0	0,156	0,16
23	8	M	25,0	0,150	0,16
24	9	M	27,0	0,162	0,18
25	9	M	25,0	0,150	0,16

Fonte: Pereira (2023).

**APÊNDICE B - VOLUME DE SOLUÇÃO ANESTÉSICA APLICADA AOS GRUPOS EXPERIMENTAIS G3 II E G4 PELA VIA INTRAPERITONEAL – EXPERIMENTO 2**

Tabela 20 - Volume de solução anestésica administrada para o Grupo G3 II (50mg/kg Tiletamina/zolazepam + 8mg/kg Xilazina + 5mg/kg Tramadol)

Identificação do Animal	Diluição do vírus	Sexo	Peso no D0 (g)	Solução anestésica (mL)	
				Calculada	Administrada
33	10 <sup>-6</sup>	F	21,9	0,131	0,14
34	10 <sup>-6</sup>	F	23,4	0,140	0,14
35	10 <sup>-6</sup>	F	24,6	0,148	0,16
36	10 <sup>-6</sup>	F	22,0	0,132	0,14
37	10 <sup>-6</sup>	M	26,2	0,157	0,16
38	10 <sup>-6</sup>	M	30,5	0,183	0,20
39	10 <sup>-6</sup>	M	27,0	0,162	0,18
40	10 <sup>-7</sup>	M	26,5	0,159	0,16
41	10 <sup>-7</sup>	M	26,6	0,160	0,16
42	10 <sup>-7</sup>	M	27,3	0,164	0,18
43	10 <sup>-7</sup>	M	29,8	0,179	0,18
44	10 <sup>-7</sup>	F	23,5	0,141	0,16
45	10 <sup>-7</sup>	F	22,2	0,133	0,14
46	10 <sup>-7</sup>	F	22,2	0,133	0,14
47	10 <sup>-8</sup>	F	24,8	0,149	0,16
48	10 <sup>-8</sup>	F	23,1	0,139	0,14
49	10 <sup>-8</sup>	F	23,1	0,139	0,14
50	10 <sup>-8</sup>	F	25,0	0,150	0,16
51	10 <sup>-8</sup>	M	26,9	0,161	0,18
52	10 <sup>-8</sup>	M	26,8	0,161	0,18
53	10 <sup>-8</sup>	M	25,0	0,150	0,16

Fonte: Pereira (2023).

Tabela 21 - Volume de solução anestésica (acepromazina + tramadol) administrada para o Grupo G4 (1 mg/kg Acepromazina + 5mg/kg Tramadol + Isoflurano 5% - 0,5L/min para indução e 2,5% - 0,5L/min para manutenção)

Identificação do Animal	Diluição do vírus	Sexo	Peso no D0 (g)	Solução anestésica (mL)	
				Calculada	Administrada
54	10 <sup>-6</sup>	M	28,3	0,113	0,12
55	10 <sup>-6</sup>	M	24,9	0,100	0,10
56	10 <sup>-6</sup>	M	29,0	0,116	0,12
57	10 <sup>-6</sup>	M	28,0	0,112	0,12
58	10 <sup>-6</sup>	F	22,6	0,090	0,10
59	10 <sup>-6</sup>	F	24,2	0,097	0,10
60	10 <sup>-6</sup>	F	22,5	0,090	0,10
61	10 <sup>-7</sup>	M	27,4	0,110	0,12
62	10 <sup>-7</sup>	M	26,2	0,105	0,12
63	10 <sup>-7</sup>	M	27,8	0,111	0,12
64	10 <sup>-7</sup>	M	27,8	0,111	0,12
65	10 <sup>-7</sup>	F	22,4	0,090	0,10
66	10 <sup>-7</sup>	F	26,3	0,105	0,12
67	10 <sup>-7</sup>	F	24,3	0,097	0,10
68	10 <sup>-8</sup>	F	22,7	0,091	0,10
69	10 <sup>-8</sup>	F	23,9	0,096	0,10
70	10 <sup>-8</sup>	F	23,7	0,095	0,10
71	10 <sup>-8</sup>	F	24,3	0,097	0,10
72	10 <sup>-8</sup>	M	28,9	0,116	0,12
73	10 <sup>-8</sup>	M	26,9	0,108	0,12
74	10 <sup>-8</sup>	M	26,3	0,105	0,12

Fonte: Pereira (2023).