

Microdissecação fisiológica *a fresco*: uma nova visão sobre a anatomia de anfíbios e répteis

Antonio Sebben

Quem quiser aprender a organização dos seres vivos, não pode prescindir de preparações (dissecações). Somente através delas se tornam claras as relações morfológicas funcionais e topográficas, só através delas se tornam aparentes e gravadas as diferenças e a admirável complexidade orgânica (KÜKENTAL *et al.*, 1986, p.8).

Resumo

No presente artigo apresento uma nova metodologia para estudos de anatomia de anfíbios e répteis, denominada **microdissecação fisiológica *a fresco***. O método consiste de dissecações sob lupa, acompanhada de documentação fotográfica de estruturas e órgãos, de espécimes mergulhados em solução salina isotônica de cloreto de sódio, durante todo o processo. Esse procedimento garante a manutenção das características morfofisiológicas do animal e torna possível o desenvolvimento do trabalho por várias horas, em condições adequadas para a dissecação, observação e documentação fotográfica. O método permite a visualização de estruturas com fidelidade de cor, forma, volume e relações anatômicas, sem a interferência de sangue ou de coágulos sanguíneos. Na produção fotográfica, são evitados problemas como reflexos indesejáveis de luz, deformações, sobreposições e aderência de tecidos, especialmente em se tratando de estruturas viscerais. Como premissa para a prática anatômica, também são discutidos aspectos relacionados à metodologia utilizada para anestesia e eutanásia.

Palavras-chave: Anatomia, Microdissecação, Microfotografia, Anestesia, Eutanásia.

Abstract

Herein I present a new methodology procedure to study the anatomy of amphibians and reptiles, called **physiologic microdissection *a fresco***. The method is based on dissection under stereomicroscope and photographic documentation of structures and organs of specimens in an isotonic saline solution of sodium chloride, during this process. This procedure maintains the morphophysiological characteristics of the specimen, making possible optimal conditions of dissection, observation and photographic documentation for hours. By this method, the visualization of structures in its true color, shape, volume and anatomical relations assured, without the influence of blood or sanguine clotting. The photographic conditions of macro and microphotographies are improved substantially, even in the preserved specimens. The procedure also allows

Aceito em setembro de 2005.

Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas Universidade de Brasília, 70910-900, Campus Universitário, Brasília, DF, Brasil - sebben@unb.br

the undesirable reflections of light, deformations and tissue overlapping, specially in the visceral structures. As premise to the anatomic practice, I also discuss the methodology aspects regarding the anaesthesia and euthanasia.

Key words: Anatomy, Microdissection, Microphotography, Anaesthesia, Euthanasia.



Introdução

A utilização de caracteres morfológicos internos na classificação e na determinação de relações entre anfíbios foi iniciada por COPE (1865). A partir de então, o conhecimento a respeito da anatomia dos anfíbios teve grande avanço com os trabalhos de HOFFMANN (1873-78) e de GAUPP (1896). Até hoje, as pranchas de miologia de anfíbios produzidas por Gaupp são reproduzidas em capítulos de anatomia de livros que tratam de biologia de anfíbios. Quanto aos répteis, a série *Biology of the Reptilia* tem seu volume 19 dedicado à morfologia (GANS, 1969). O atlas sobre anatomia de tartarugas marinhas de WYNEKEN (2001), traz ampla documentação fotográfica e detalhada descrição sobre a morfologia desse grupo. Trata-se de um dos trabalhos mais completos já publicados em anatomia herpetológica.

No Brasil, poucos pesquisadores se dedicaram à anatomia de anfíbios e dos diferentes grupos de répteis. SAWAYA (1940) produziu um dos raros trabalhos a respeito do sistema cardiovascular do anfíbio ápoda *Siphonops annulatus*. Entre os répteis, cabe destacar os trabalhos sobre anatomia de serpentes de GOMES *et al.* (1989) e GOMES & PUORTO, 1993.

Além de sua importância para a anatomia e para a herpetologia, os anfíbios também estiveram presentes, como objeto de pesquisa, em momentos marcantes da ciência, como os compilados por ROCHA & SILVA (1973) e HICKMAN *et al.* (2003); alguns dos quais são resumidamente apresentados a seguir: a descoberta da bioeletricidade, em

preparações de músculos de rã, por GALVANI (apud BRESADOLA, 1998), no século XVIII; a demonstração da autonomia das câmaras cardíacas e da presença de um marca-passo na primeira delas, o seio venoso, em coração de rã, por STANNIUS (1852); a importância dos íons na contração do coração de rã e na composição dos fluidos orgânicos, descoberta por RINGER (1880); a demonstração de LOEWI (1912), em preparações de coração isolado de rã, da existência de um neurotransmissor (acetilcolina), criando o conceito de transmissão neuro-humoral; mais recentemente, GURDON *et al.* (1971) preconizaram o uso de oócitos de anuros para estudos de RNA mensageiro e expressão gênica que, aliada à técnica de *patch-clamp*, proporcionou considerável avanço nos estudos de excitabilidade celular, de canais iônicos e de farmacologia.

Os anfíbios, como vimos, têm gerado excelentes modelos para estudos básicos de fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Tanto quanto os répteis, apresentam características morfológicas próprias que, com observação atenta e cuidadosa, revelam importantes aspectos a respeito de suas biologias.

Muitos caracteres são utilizados na sistemática dos grupos recentes, especialmente os advindos da osteologia. TRUEB (1973) já chamava a atenção para a importância dos caracteres osteológicos, por serem os únicos que permitem compreender a relação dos registros fósseis com os grupos atuais. Entretanto, no que se refere à anatomia visceral, poucos *taxa* tiveram seus

sistemas orgânicos estudados em detalhes. As variações intraespecíficas dos órgãos internos são praticamente desconhecidas para a maioria das famílias (DUELLMAN & TRUEB, 1986). Segundo esses autores, muito mais trabalhos descritivos serão necessários antes que caracteres dos sistemas internos sejam empregados, com confiança, em estudos evolutivos.

Anatomia animal e Anatomia herpetológica

Nos seres vivos, estrutura e função são intimamente relacionadas. Esse conceito básico da biologia seria suficiente para justificar a importância do estudo da anatomia dos diferentes organismos, com o emprego das mais diversas abordagens. O conhecimento das estruturas anatômicas é aplicável em inúmeras áreas da biologia e das ciências biomédicas, tais como fisiologia, embriologia, taxonomia, sistemática, entre outras.

A despeito de sua importância, a anatomia descritiva clássica tem sido relegada à condição de coadjuvante nessa era de avanço do conhecimento molecular. Nos currículos de graduação em ciências biológicas a carga horária dedicada à anatomia animal e à prática anatômica é geralmente reduzida ou inexistente. Muitos estudantes chegam aos programas de pós-graduação sem nunca terem praticado dissecações. Mesmo nos cursos de medicina veterinária, que normalmente possuem maior carga horária curricular em anatomia animal, a morfologia macroscópica dos grupos basais de vertebrados é praticamente desconsiderada. Agravando ainda mais o problema, as publicações que abordam comparativamente a anatomia animal, quando não o fazem de forma genérica e pouco detalhada, pecam pela falta de boas ilustrações. É comum livros ou roteiros de estudos omitirem figuras de estruturas “difíceis de serem observadas”.

Além disso, certos livros apresentam figuras que, embora sejam úteis e até certo ponto imprescindíveis para a compreensão do conteúdo teórico, não atendem às necessidades requeridas pelo trabalho de dissecação e de observação em anatomia. Em muitos casos, as figuras esquemáticas representam o único recurso disponível (HÖFLING *et al.*, 1995; HILDEBRAND, 1988). Algumas, muito genéricas, omitem detalhes importantes das estruturas anatômicas e, invariavelmente, representam espécies estranhas à nossa fauna (YAPP, 1965; KÜKENTHAL *et al.*, 1986; WALKER & HOMBERGER, 1992). Esses problemas também ocorrem em publicações que trazem imagens fotográficas (KING & CUSTANCE, 1982). Nos atlas de anatomia veterinária, os peixes, os anfíbios e os répteis são simplesmente ignorados.

Esses problemas tornam difícil a tarefa de orientar e estimular estudantes para a anatomia, particularmente em se tratando de anfíbios e répteis.

Com a metodologia aqui apresentada, esperamos contribuir para a mudança desse quadro, com a implementação de novos referenciais para a anatomia herpetológica, onde o nível de detalhes e a qualidade das imagens geradas permitam ao observador uma melhor compreensão das relações anatômicas e das reais características dos diferentes órgãos e tecidos, o que vai além do simples reconhecimento destes. Isso, de certo, também se aplica à anatomia dos outros grupos de vertebrados.

Visamos também, buscar um melhor aproveitamento do material biológico, com base na dissecação e documentação de estruturas anatômicas, previamente ao tombamento de espécimes em coleções científicas. Esse procedimento, além de melhorar a qualidade e a confiabilidade dos dados de morfologia interna, pode trazer novas perspectivas para a sua aplicação.

Anatomia em escala semi-microscópica

Classicamente, aprendemos a usar microscópios estereoscópicos (ou lupas) apenas quando trabalhamos com espécimes pequenos de vertebrados. Em herpetologia, por exemplo, esse recurso é utilizado regularmente quando se estuda reprodução, desenvolvimento larvário de anfíbios ou embriologia de répteis.

A morfologia animal observada em escala intermediária, por meio de lupas, pode ampliar sobremaneira o nível de detalhes observáveis durante uma dissecação fisiológica *a fresco* e mesmo quando se utiliza material previamente fixado. Esse recurso possibilita visões inéditas das estruturas anatômicas e proporciona imagens com perspectivas ímpares, impossíveis de serem obtidas na observação direta (macroscópica), comumente adotada em práticas de dissecações. Quando equipadas com diafragma, o nível de detalhes é enriquecido pela perspectiva tridimensional, obtida com a ampliação da profundidade de campo. Para isso, deve-se trabalhar com diafragma o mais fechado possível.

A iluminação adequada é um outro aspecto tecnicamente importante. A utilização de iluminação dupla, a partir de duas fontes de luz, possibilita variar a incidência da luz sobre as estruturas. Esse recurso permite a obtenção de sombras que, bem dosadas, acentuam o contraste, favorecendo a definição das imagens e melhorando a profundidade de campo.

No tecido fresco, os vasos sanguíneos, além de se constituírem em importantes elementos anatômicos, auxiliam a composição visual, aumentando o contraste e estabelecendo limites para muitas estruturas. A diferenciação desses vasos, muito fácil nas dissecações *a fresco*, traz consigo um grande número de dados anatômicos, muitos deles impossíveis de serem obtidos em espécimes fixados.

Nas condições aqui descritas, o tamanho do animal não é fator limitante. A dissecação fisiológica *a fresco* facilita o estudo de espécimes de pequeno porte, inclusive de embriões e larvas.

Material didático e Ensino de anatomia

Como material didático de rotina ou para treinamento de dissecação sob lupa, recomendamos a utilização da rã-touro (*Rana catesbeiana*), por se tratar de espécie criada em cativeiro para fins comerciais. Vale lembrar que, para utilização de espécies nativas, é necessária a obtenção prévia de licença do IBAMA.

No que se refere ao ensino da anatomia, entendemos que dissecações tradicionais, com animais fixados em pranchas de cortiça ou em cubas com fundo de parafina, impossibilitam a visualização de detalhes importantes das diferentes estruturas orgânicas. Além disso, em pouco tempo, o acúmulo de sangue, o ressecamento dos tecidos e o aspecto geral do animal dissecado tornam o trabalho desestimulante e pouco proveitoso para os estudantes.

De fato, sou de opinião que a dissecação de animais não deve se constituir em atividade obrigatória para todos os alunos de graduação em biologia. Aqueles com real interesse pela anatomia, devem ter a oportunidade de praticar dissecações em disciplinas optativas ou em estágios. Isso porque, a prática da dissecação não deve ser uma atividade de massa, realizadas por turmas de 20 ou 30 alunos em um laboratório, mas exercida simultaneamente por poucas pessoas, em ambiente ventilado e agradável. Em suma, a dissecação não deve ser banalizada.

Práticas de dissecação não têm sido fornecidas nas disciplinas obrigatórias do curso de Ciências Biológicas da UnB. Estudantes, estagiários de graduação e bolsistas de iniciação científica, que trabalham com herpetologia, são treinados no

Laboratório de Anatomia Comparativa de Vertebrados (LACV-UnB). Para estudantes de pós-graduação, oferecemos a disciplina Anatomia de Anfíbios e Répteis, com turmas de, no máximo, 10 alunos.

Atualmente, diversos autores disponibilizam material didático na internet, muitos deles de qualidade questionável. Para temas gerais de biologia e de anatomia comparativa, milhares de imagens, entre fotografias e desenhos, estão disponibilizados pela Universidade de Ottawa, Canadá, no sítio denominado BIODIDAC. O acesso é livre pelo endereço <http://biodidac.bio.uottawa.ca>.

Fotografias de anatomia herpetológica e de anatomia comparativa de vertebrados produzidos no LACV-UnB, com o emprego dos métodos aqui descritos, podem ser acessados no sítio: www.unb/ib/cfs/sebben/anatomia. O material disponibilizado nessa página também é de acesso livre, sendo vetado seu uso comercial.

Anestesia, analgesia e eutanásia

Analgesia, definida como ausência de sensibilidade à dor, é obtida por meio de administração adequada de substâncias anestésicas. Embora seja difícil determinar antropomorficamente o grau de dor ou desconforto experimentado por animais durante procedimentos e manipulações experimentais, algumas medidas são preconizadas como humanamente aceitáveis para evitar o sofrimento físico e psíquico dos animais, segundo recomendações da Associação Americana de Medicina Veterinária - AVMA (JAVMA, 2001).

A anestesia deve ser usada sempre que animais sejam submetidos a procedimentos cirúrgicos. A instalação da analgesia deve assegurar a inibição completa da dor e a posterior recuperação

do animal. Entretanto, em se tratando de estudos anatômicos ou similares, os animais são mortos a fim de conservá-los, inteiros ou em partes. Nesse caso, a analgesia deve levar à morte sem ocorrência de dor, sem causar desconforto ao animal e sem riscos de reversão do quadro anestésico. Neste caso, estamos nos referindo à **eutanásia**.

Nas diversas áreas da biologia, o conhecimento científico se dá às custas de um certo número de vidas animais, o que, naturalmente, provoca constrangimento e, por vezes, angústia em muitos pesquisadores e estudantes. A morte de determinado número de animais é uma das conseqüências inexoráveis da busca do conhecimento científico, inclusive com propósito de conservação das espécies. Desta forma, minimizar o sofrimento dos animais utilizados em prol da ciência é um preceito ético fundamental que deve ser trabalhado com os estudantes desde o início de seu processo de formação acadêmica.

Não é apropriado se referir à morte dos animais para finalidades didático-científicas como sacrifício. A morte induzida de animais deve ser designada pelo vocábulo eutanásia, termo que define com precisão este procedimento (de origem grega, o termo significa “boa morte” *eu* = bom, *thanatos* = morte). A eutanásia, portanto, é o ato de induzir morte de forma ética e humanamente aceitável a um animal.

A AVMA recomenda uma série de métodos para a eutanásia de animais. Esses métodos atendem à maioria dos casos e devem ser sempre observados, a menos que haja pareceres diferenciados por parte de comitês institucionais de ética em cuidados e uso animal. São os seguintes:

Métodos aceitáveis: são aqueles que, de forma consistente e inequívoca, produzem morte humanamente aceitável quando utilizados como único

método de eutanásia como, por exemplo, overdose de anestésico;

Métodos condicionalmente aceitáveis: são os que, pela natureza das técnicas ou pelo grande potencial de erro do operador, não têm segurança de produzir, de maneira consistente, morte humanamente aceitável. Inclui-se também nesse item métodos que não são bem documentados na literatura científica. Não temos exemplos para anfíbios e répteis que se enquadrem nessa categoria. Para grandes mamíferos, citamos como exemplo a eletrocução;

Métodos inaceitáveis: são os métodos julgados desumanos sob quaisquer condições (por exemplo: resfriamento) ou aqueles que representem substancial risco a quem os aplicam, como por exemplo o emprego do clorofórmio (agente cancerígeno);

Métodos coadjuvantes: são aqueles que devem ser utilizados em conjunção com outros métodos aceitáveis na promoção da eutanásia, como por exemplo o resfriamento antecedido por analgesia profunda.

Para anfíbios e répteis, são considerados aceitáveis os seguintes métodos:

Agentes injetáveis ou inalantes: barbituratos, anestésicos inalantes (somente para algumas espécies), CO₂, MS222 (Tricaína Metano Sulfonato - TMS), Hidrocloreto de Benzocaína.

Métodos físicos: espinhalação dupla, cérebro-espinhal, *via foramen magnum* (para anfíbios); decapitação, seguida de espinhalação encefálica (para anfíbios e répteis).

Dentre os métodos considerados inaceitáveis, o resfriamento de répteis e anfíbios é, talvez, um dos mais comumente utilizados, baseando-se no argumento de que reduz o metabolismo, induz letargia e facilita o seu manuseio dos animais. No entanto, não há evidências de que o resfriamento reduza a sensibilidade à dor. Desta forma, a prática de resfriamento para imobilização de animais ectotérmicos é considerada inaceitável e desumana.

Também são considerados métodos inaceitáveis: embolia gasosa, traumatismo craniano, hidrato de cloral, clorofórmio, gás cianídrico e cianuretos, descompressão, afogamento, exsanguinação (sem sedação prévia), imersão em formol, estricnina e bloqueadores neuromusculares (uso isolado de cloreto de potássio, sulfato de magnésio, nicotina e todos os curarizantes).

O éter etílico, embora ainda utilizado, não é recomendado para animais com capacidade anaeróbica, como muitos anfíbios e répteis. Além disso, por se tratar de produto altamente volátil, seu transporte oferece risco, não sendo, portanto, indicado para uso, especialmente em atividades de campo.

O dióxido de carbono (CO₂) também pode ser empregado na eutanásia de anfíbios e répteis. Embora a perda de consciência se instale com certa rapidez, o tempo de exposição para eutanásia, em geral, é prolongado. Além disso, a capacidade anaeróbica das diferentes espécies é variável (JAVMA, 2001).

Na falta de orientações que atendam indiscriminadamente às diferentes espécies e às diversas abordagens da pesquisa, o bom senso deve prevalecer. Em caso de dúvidas quanto à metodologia a ser adotada ou no caso de modificações nos métodos indicados pela AVMA, é recomendável que o pesquisador responsável

submeta seus protocolos de pesquisa a **comitês de ética em pesquisa com uso animal**, indicando com clareza o tipo de conduta proposta para a prática da eutanásia ou do procedimento cirúrgico, conforme o caso. Por exemplo, os procedimentos utilizados na rotina do Laboratório de Anatomia Comparativa de Vertebrados do Departamento de Ciências Fisiológicas da UnB são submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Brasília.

Anestésicos - vias de administração e dosagens

A anestesia por imersão vem sendo utilizada tanto em peixes quanto em anfíbios desde 1920, a partir do desenvolvimento dos anestésicos locais (DOWNES *et al.*, 1994). Embora com vias de absorção diferentes, através de brânquias nos peixes e da pele nos anfíbios, o resultado final é uma eficiente analgesia, em diferentes graus, em uma relação dose dependente.

Para répteis, também são utilizados anestésicos do grupo dos barbitúricos, como o tiopental e o pentobarbital (nembutal) sódico, que atuam deprimindo o sistema nervoso central. O fato de serem drogas de venda controlada dificulta o seu uso em condições de rotina. DOWNES *et al.* (1999) demonstraram que, em *Rana catesbeiana*, o tiopental pode ser usado em doses elevadas na indução de eutanásia, mas não como anestésico em procedimentos cirúrgicos.

A Tricaína (MS 222) é um derivado de benzocaína utilizado para eutanásia de peixes e anfíbios, apresentando como inconveniente o elevado custo para os padrões brasileiros (cerca de US\$ 90.00/100g). Outros anestésicos locais são igualmente eficientes na analgesia e imobilização de anfíbios, com a vantagem de possibilitar o uso de diferentes vias de inoculação.

Tanto a lidocaína quanto a bupivacaína são

anestésicos locais consagrados, que trazem como vantagens o fato de terem ação rápida, de serem disponíveis já em solução, dispensando preparo, de baixo custo e não exigem maiores cuidados no armazenamento e transporte. São comumente usados na clínica médica, tanto na dessensibilização tópica quanto em cirurgias de grande porte, na forma de anestesia raquidiana e peridural. Diversos pesquisadores têm utilizado outras formulações, como a pomada de Xilocaina, que é fácil de transportar, porém requer solubilização em água para ser administrada por via sistêmica.

Para a maioria dos anestésicos locais, o mecanismo de ação é baseado no bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem. Esses canais estão presentes tanto em fibras nervosas motoras (eferentes) quanto nas sensitivas (aférentes). Na anestesia, a reversibilidade é condição indispensável, com cessação dos efeitos com o tempo. Na eutanásia, ao contrário, a irreversibilidade dos efeitos do anestésico **deve ser garantida** pela elevada dosagem utilizada.

Embora os sinais de ataxia e de imobilidade sejam de fácil verificação, a dessensibilização à dor não é tão evidente e requer a realização de alguns testes antes de dar início às incisões. Deve-se verificar, portanto, a ausência de resposta a estímulos do tipo pinçamento de extremidades, cessação de movimentos da região gular (para anfíbios) e de reflexos ao toque na córnea. Internamente, determinadas estruturas ainda podem manter certo grau de atividade, como o coração e o tubo digestório, pois esses órgãos são naturalmente mais resistentes à ação de anestésicos locais.

Dosagem

A resposta a um anestésico pode variar em função da concentração ou do volume de solução injetado. Essa relação é mais importante nos casos

de anestesia com fins cirúrgicos, o que não é o objetivo do presente estudo. Assim, para a eutanásia recomenda-se o uso de soluções concentradas, que podem ser inoculadas em pequenos volumes e garantem a irreversibilidade da analgesia e a manutenção da inconsciência.

Para larvas ou pequenos anuros, do porte de uma *Dendropsophus minutus* (em torno de 30 mm de comprimento rostro-cloacal), por exemplo, o contato direto com soluções de lidocaína, em concentrações entre 1,5 e 5,0 mg/ml é muito eficiente, graças à rápida difusão cutânea do anestésico. Nesse caso, o tempo necessário para a instalação da analgesia completa varia em função da concentração utilizada. Com boa margem de segurança, recomenda-se para cloridrato de lidocaína 1,5 mg/ml cerca de cinco minutos de contato. A inoculação complementar de volumes em torno de 0,1 ml, por via intra-pleuroperitoneal (ipp), pode ser administrada para garantir uma overdose com segurança e a instalação do quadro irreversível desejado. Para espécimes de porte intermediário, como *Scinax fuscovarius* (em torno de 50 mm de CRC), ou de grande porte, como exemplares adultos de *Bufo marinus* (em torno de 200 mm de CRC), a complementação deve ser feita diretamente no sistema nervoso central, via *foramen magnum*. O resultado é rapidamente observado, com imobilização total estabelecendo-se em poucos segundos.

Para répteis em geral, é recomendável o uso de derivados do ácido barbitúrico. Esses agentes deprimem o sistema nervoso, causando perda de consciência progressiva. Em overdoses, a anestesia profunda progride para apnéia devido à depressão do centro respiratório. Para eutanásia são recomendadas doses entre 60 a 100 mg/Kg de Pentobarbital Sódico (JAVMA, 2001).

Na rotina do LACVUNB, utiliza-se, para

anfíbios, o Cloridrato de Lidocaína (1,5 a 5,0 mg/ml) ou Cloridrato de Bupivacaína (0,75 a 2,0 mg/ml). As vias de administração preferenciais são a absorção cutânea, ou injeção na cavidade pleuroperitoneal, excelentes para girinos e anuros de pequeno e médio porte, e intracraniana, através do *foramen magnum*, para espécimes maiores. Os volumes injetados variam de 0,1 a 1,0 ml de solução, dependendo da concentração do anestésico e do tamanho do espécime. Nesses casos, cuidados adicionais devem ser tomados quando o sistema nervoso central for o objeto da pesquisa. Para tanto, deve-se usar agulhas hipodérmicas finas e concentrações elevadas de anestésico, para injetar o menor volume possível. Para répteis, utiliza-se o Nembutal (pentobarbital sódico), disponível em ampolas, na concentração de 50 mg/ml. A administração pela via intrapleuroperitoneal tem se mostrado eficiente e segura.

Vale lembrar que, atendidas as recomendações básicas quanto aos procedimentos e agentes utilizados, a experiência vivenciada para cada caso deve ser considerada. Há espécies que reagem de forma distinta de outras em relação a determinados anestésicos ou a dosagens destes. Se o intuito for induzir analgesia temporária, o controle de dosagem deve ser muito mais rigoroso.

Técnicas de microdissecação

Material cirúrgico

Vale ressaltar que, embora em preparações de microdissecações o principal instrumento seja a paciência, é simplesmente impossível realizar procedimentos delicados sem dispor de instrumental apropriado para microcirurgia. Como o instrumental tem custo relativamente elevado, a sua escolha deve atender a preferências pessoais e, evidentemente, o poder aquisitivo do comprador.

Os instrumentos considerados

indispensáveis são os seguintes:

Tesouras: os modelos *castroviejo* ou similares, utilizados em cirurgias de córnea, são instrumentos obrigatórios. Funcionam como pinças, o que permite controle delicados e precisos das incisões. Existem vários modelos, com ponta reta ou curva; as melhores são as importadas;

Pinças: o ideal é dispor de um conjunto com pelo menos três pinças, sendo duas de ponta fina, uma reta, uma curva e uma de ponta ultrafina;

Pinças hemostáticas: especialmente as destinadas para micro-cirurgias, são fundamentais, tanto para obliterar vasos que deverão ser seccionados, quanto para estancar sangramentos decorrentes de rupturas ou secções acidentais de vasos. São úteis também, como presilhas ou instrumentos de apoio, para auxiliar o deslocamento e o tracionamento de diversos tecidos e órgãos. O ideal é dispor de modelos e tamanhos variados. Essas pinças equivalem, em pequena escala, às pinças de Kelly, usadas em animais de médio ou grande porte;

Alfinetes: no método de microdissecação, os tecidos e órgãos são preferencialmente afastados ou tracionados ao invés de seccionados e removidos. Nessas tarefas, muitos alfinetes são utilizados para fixação de pele e de outros tecidos durante todo o procedimento.

Alfinetes entomológicos de aço inoxidável são muito úteis. De diferentes tamanhos e espessuras, é possível escolher as adequadas em

função do porte do material em estudo. Além disso, possuem vida útil indefinida, resistindo à oxidação pelo contato com soluções salinas.

Parte do material utilizado nas dissecações pode ser adquirido em casas especializadas em produtos médico-hospitalares. No mais, muitos instrumentos devem ser adaptados e modificados de modo a atender às necessidades das preparações. Assim, alicates de uso doméstico, utilizados na remoção de cutículas, podem ser transformados em excelentes micro-osteótomos, com a diminuição do tamanho de suas lâminas em esmeril.

Cubas de dissecação

A utilização de cubas metálicas de diferentes volumes e profundidades é recomendada para a acomodação dos animais, conforme o seu tamanho. O bordo das cubas não deve ser muito elevado, de modo a possibilitar a utilização do instrumental cirúrgico em ângulos menores que 35°. O fundo deve ser preenchido com cera de modelagem odontológica, mais maleável que parafina, que pode ser adquirida em casas especializadas em produtos protéticos ou odontológicos. Dentre as vantagens desse material, destacam-se sua melhor aderência ao recipiente, mesmo aos de aço inoxidável ou de superfície esmaltada, mas, principalmente, por se tratar de material maleável, facilitando a fixação dos alfinetes e possibilitando seu tracionamento, mesmo estando fixado, sem que ocorra ruptura e despregamento do material. Essa característica é de suma importância para os ajustes finos necessários ao posicionamento de estruturas e composição do campo fotográfico.

Imersão em salina fisiológica

A opção pela técnica de dissecação em

salina fisiológica tem na sua origem os trabalhos de farmacologia, onde tecidos e órgãos, após dissecação, são mantidos vivos em experimentos *in situ* ou *ex situ*. Nessas condições, a aparência e a arquitetura dos órgãos e estruturas chama a atenção pela sua beleza e arquitetura peculiar.

O resultado dos métodos aqui propostos, tanto do ponto de vista da dissecação, mas especialmente no que se refere à qualidade do registro fotográfico, são obtidos graças à imersão dos animais em solução salina isotônica (solução de Cloreto de Sódio - NaCl - 0,65% para anfíbios e 0,75% para répteis). Soluções salinas fisiológicas mais completas (solução de Ringer para anfíbios, por exemplo) são recomendadas em casos de remoção de tecidos e órgãos a serem processados por outras técnicas, como histologia ou microscopia eletrônica.

Logo na primeira experiência é possível perceber a importância e o potencial da técnica de dissecação em animais submersos em solução salina. Além de evitar dessecação, aderência dos tecidos e a presença indesejável de reflexos, a imersão permite:

que se identifique com rapidez a origem de pontos hemorrágicos decorrentes de secção de vasos ou de ruptura de tecidos;

uma melhor visualização e controle do campo de trabalho, possibilitando facilmente a localização e remoção de partículas indesejáveis e de sangue, em casos de hemorragia;

a realização de incisões delicadas, especialmente em se tratando de tecidos de sustentação, como mesentério, pericárdio e outros;

o deslocamento seguro de órgãos;

a manutenção de condições morfo-fisiológicas básicas por mais tempo, aumentando o tempo de trabalho e a qualidade da dissecação;

baixo custo, pois há necessidade de

substituição sucessiva da solução salina, visando a obtenção de campos fotográficos livres de partículas indesejáveis;

condições adequadas para a observação e coleta de endoparasitas;

condições adequadas para realização de canulações de vasos, com vistas à perfusão de órgãos ou coleta de sangue.

Sistema de sucção

A submersão de animais inteiros durante a dissecação gera um bom número de problemas, tais como, presença de bolhas de ar, partículas de poeira do ambiente, secreções, fragmentos de tecidos, sangue, gordura, etc. A remoção desses materiais indesejáveis constitui condição *sine qua non* para a obtenção de resultados fotográficos adequados. Para tanto, é indispensável o uso de sistemas de sucção, como bombas de vácuo ou de sucção com frascos armadilha. Esse equipamento pode ser substituído por uma trompa de vácuo (utilizada em laboratórios de química) conectada a uma torneira. Também são úteis as pipetas Pasteur, empregadas na aspiração de pequenos volumes de líquidos e de materiais delicados.

Documentação fotográfica

O registro fotográfico é indubitavelmente a mais fidedigna técnica de documentação científica. No caso da anatomia, os registros fotográficos são, além de excelente material didático, imprescindíveis na pesquisa científica. Importante também é o fato de que o tempo investido na documentação fotográfica é muito menor do que aquele dedicado à produção de desenhos. Como praticamente todas as formas de vida podem ser fotografadas, inclusive as fossilizadas, é evidente que se tenha um grande espectro de ação da técnica fotográfica.

Como exemplo, tomemos o problema clássico do reflexo da luz, quase sempre indesejável na fotografia. Com raras exceções, estruturas anatômicas refletem a luz em virtude de brilho natural ou da umidade que as recobre, especialmente em se tratando de formas convexas. Os reflexos são ainda mais problemáticos nas técnicas de microfotografia, que requerem iluminação intensa e quando se trabalha com tecidos e estruturas *a fresco*, ou seja, animais recém mortos ou anestesiados. Desta forma, a imersão em solução salina isotônica resolve facilmente esse tipo de problema.

Para microfotografias, com aumento de até 60x, é necessária uma lupa equipada com sistema fotográfico. Preferencialmente, essa lupa deve possuir diafragma para o controle da luminosidade. Com esse recurso, a qualidade final das fotografias tende a ser melhor do que as obtidas com lupas sem diafragma. O princípio é o mesmo utilizado em câmaras fotográficas convencionais: quanto menor a abertura do diafragma, maior o tempo de exposição e, conseqüentemente, maior a profundidade de campo, resultando em fotos mais contrastadas e com maior resolução.

Para animais de médio porte, as fotos com tomadas mais gerais podem ser obtidas com o uso de câmaras reflex 35mm, equipadas com lente macro (50 ou 100 mm), ou lentes normais com anéis close-up. Atualmente, vem crescendo a disponibilidade de sistemas digitais, com zoom óptico equivalente. No entanto, em termos de qualidade de imagem, os cromos ainda são a melhor opção. No LACV-UnB, os melhores resultados tem sido obtidos com o filme Provia ISO 100, da FUJI.

Tanto em sistemas para macro, quanto para microfotografia, a iluminação adequada é fator determinante no resultado final da fotografia. Para lupas, se recomenda uso de iluminadores com lâmpadas de xenônio, munidos de dois feixes de

fibras ópticas. Para sistemas de câmaras fotográficas reflex, o mais adequado é o uso de lâmpadas *foto-flood*, próprias para fotografia. Nos dois casos, deve-se utilizar filtro azul (80A), para correção do amarelo e observar o correto ângulo de incidência da luz.

Dissecação *a fresco* x dissecação de animais fixados

Na observação e documentação de caracteres morfológicos de anfíbios e de répteis, o uso de animais íntegros, em preparações *a fresco*, traz inúmeras vantagens quando comparado ao emprego de espécimes preservados. A mais importante, sem dúvida alguma, é a possibilidade de observar as reais características dos organismos. Há ainda aspectos como a preservação da coloração, da textura e das relações de forma e de volume entre os diferentes órgãos e tecidos, características rapidamente alteradas nos animais fixados. Além disso, a elasticidade e maleabilidade dos tecidos frescos garantem maior liberdade e desenvoltura no decorrer da dissecação, facilitando o próprio estudo da anatomia e a adoção de melhores ângulos de enquadramento para as diferentes estruturas. Em contraste, o material preservado impossibilita o manuseio com liberdade, pois os tecidos fixados se tornam friáveis, rompendo-se com facilidade quando pinçados ou tracionados. Nos animais preservados a forma de muitos órgãos é alterada por compressão ou por retração dos tecidos.

Um dos aspectos mais relevantes, do ponto de vista da anatomia para preparações *a fresco*, está na possibilidade de reconhecimento de artérias e veias sem a necessidade de injeção de resinas e corantes. Quando necessário, a técnica de submersão facilita a prática de canulação de vasos, muito comum em experimentos que requerem administração de drogas ou em preparações

permanentes com uso de corantes ou resinas.

Conclusões

Dissecações de animais devem ser praticadas sob a orientação de pessoas preparadas, técnica e emocionalmente. Não devem causar estresse emocional ou angústia em que as executa ou nas pessoas que porventura acompanhem sua execução. Requerem rigor, tanto no planejamento quanto na execução, e são justificáveis quando destinadas à geração e à divulgação do conhecimento científico.

O sucesso de uma boa dissecação reside especialmente no cuidado, na paciência e no respeito ao trabalho e aos animais. Embora não se busque a reconstituição do organismo ao final do procedimento, a dissecação deve ser praticada como uma cirurgia, onde pequenos detalhes podem se tornar determinantes para o resultado final do trabalho.

Em anatomia, muitas vezes o que fascina são exatamente esses detalhes, a busca e a perseverança para revelar o que não é evidente ou facilmente observável. Não se trata de decorar nomes, mas compreender processos e relações entre forma e função, identificando os principais aspectos adaptativos expressos nos diferentes sistemas orgânicos. A anatomia é muito mais interessante quando se toma por referência o organismo vivo, mesmo quando, para isso, temos que dispor de material morto e fixado. No entanto, o ideal é que se possa fazer uso de animais anestesiados ou recém-mortos. Nessas condições são preservadas características importantes como forma, cor e textura, que se perdem após a fixação. Tais características podem ser determinantes tanto na obtenção de dados científicos quanto no processo de aprendizado em anatomia. Ao examinarmos espécimes fixados, tentamos muitas vezes fazer

elucbrações de como seriam em vida as suas estruturas. Isso mostra que trabalhamos com uma lógica e uma tradição invertidas. Habituo-nos a matar e fixar o animal primeiramente, para, depois, estudarmos sua anatomia. Por que não inverter essa tradição, reservando exemplares para dissecações *a fresco*, seguidas de documentação fotográfica?

Com os recursos digitais disponíveis na atualidade, o processamento e armazenamento de imagens, tem-se tornado menos trabalhoso e mais acessível, em termos de relação custo-benefício.

Cabe, ainda, considerar que muitos espécimes dissecados poderão, após serem fixados, ter como destino seu tombamento em coleções didáticas ou científicas. Esse caminho, embora incomum, pode perfeitamente ser adotado, em determinados casos, com vantagens em relação à prática corrente, onde se preserva o espécime para depois dissecá-lo.

Esse trabalho objetivou o estímulo ao desenvolvimento da anatomia herpetológica. Em relação a herpetologia propriamente dita, espera-se que, utilizando as técnicas de dissecação aqui descritas, os estudantes e pesquisadores atuem na identificação de novos caracteres que sejam úteis à sistemática e filogenia. Espera-se ainda, que essas técnicas proporcionem um estímulo aos que desejam fazer uso dessa nova abordagem da anatomia, incorporando uma certa dose de arte, o que, aliás, combina com a maravilhosa obra produzida pela natureza ao longo da evolução.

Agradecimentos

Às Professoras Dra. Maria Júlia Martins Silva e Dra. Sônia Nair Bão, pelo empréstimo dos equipamentos (lupas Zeiss SV-11) utilizados no desenvolvimento do presente trabalho e de diversos projetos. À Dra. Verônica Melo Borges, minha querida companheira, pelo apoio constante e pela

revisão crítica do manuscrito. Ao amigo Natan Medeiros Maciel, pelo resumo em inglês e pelas sugestões. Aos Profs. Drs. Helio Ricardo da Silva e José Peres Pombal Júnior, pelo incentivo. Aos Srs. Washington José de Oliveira e Valter César F. Silveira, pelo suporte técnico. Aos alunos de pós-graduação e estagiários do LACV-UNB, cujo interesse pela anatomia reforçam nossas convicções e nos ajudam a seguir em frente, mesmo com as dificuldades do dia a dia. À Sociedade Brasileira de Herpetologia, pela oportunidade. Às editoras e aos revisores, pelas críticas e sugestões.

Referências Bibliográficas

- BEAVER, B.V.; REED, W.; LEARY, S.; MCKIERNAN, B.; BAIN, F.; SCHULTZ, R.; BENNETT, B.T.; PASCOE, P.; SHULL, E.; CORK, L.C.; FRANCIS-BOYD, R.; AMASS, K.D.; JOHNSON, R.; SCHMIDT, R.H.; UNDERWOOD, W.; THORNTON, G.W. & KOHN, B. Report of the AVMA panel on euthanasia. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.218: 669-696. 2001.
- BIODIDAC: A BANK OF DIGITAL RESOURCES FOR TEACHING BIOLOGY, Ottawa, Disponível em: <<http://biodidac.bio.uottawa.ca>> Acesso em 03 jul. 2005.
- COPE, E.D. Sketch of the primary groups of Batrachia Salientia. *Natural History Review*, v.5: 97-120. 1865.
- DOWES, H.; KIENLE, E.A. & PEDERSON, C. Metamorphosis and the steady state anesthetic concentrations of tricaine, benzocaine and ethanol. *Comparative Biochememistry and Physiology*, v.107: 95-103. 1994.
- DOWES, H.; KOOP, D.R.; KLOPFENSTEIN, B. & LESSOV, N. Retention of nociceptor responses during deep barbiturate anesthesia in frogs. *Comparative Biochememistry and Physiology C*, v.124: 203-210. 1999.
- DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. *Biology of Amphibians*. New York: McGraw-Hill, 1986. 670p.
- GALVANI, L. apud BRESADOLA, M. Medicine and science in the life of Luigi Galvani (1737-1798). *Brain Research Bulletin*, v.46: 367-380. 1998.
- GAUPP, E.A. *Echker's und R. Widersheim's Anatomie des Frosches*. v.2. Braunschweg: Friedrich Vieweg Und Sohn. 1896.
- GANS, C. *Biology of the Reptilia*. v.19. Morphology. New York: Academic Press, 1969. 373p.
- GOMES, N. & PUORTO, G. Atlas anatômico de *Bothrops jararaca* Wied, 1824 (Serpentes: Viperidae). *Memórias do Instituto Butantan*, v.55, n.1: 69-100. 1993.
- GOMES, N.; PUORTO, G.; BUONONATO, M.A. & RIBEIRO, M.F.M. Atlas anatômico de *Boa constrictor*. *Monografias do Instituto Butantan*, v.2: 1-59. 1989.
- GURDON, J.B.; LANE, C.D.; WOODLAND, H.R. & MARBAIX, G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, v.233: 177-182. 1971.
- HICKMAN, C.P.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. & I'ANSON, H. *Integrated Principles of Zoology*, New York: McGraw-Hill, 2003.
- HILDEBRAND, M. *Analysis of Vertebrate Structure*. New York: J. Wiley, 1988. 701p.
- HOFFMANN, C.K. Dr. H.G. *Bronn's Klassen und Ordnugen der Amphibien*. Leipzig: Winter'che Verlagshandlung, 1873-78.
- HÖFLING, E.; OLIVEIRA, A.M.S.; RODRIGUES, M.T.; TRAJANO, E. & DA ROCHA, P.L.B. *Chordata: manual para um curso*

prático. São Paulo: Edusp. 1995. 239p.

KING, G.M. & CUSTANCE, D.R.N. *Colour Atlas of Vertebrate Anatomy: an integrated text and dissection guide*. Oxford: Blackwell Scientific Publication. 138p. 1982.

KÜKENTAL, W.; MATTHES, E. & RENNER, M. *Guia de Trabalhos Práticos de Zoologia*. Coimbra: Livraria Almedina, 1986. 539p.

LOEWI, O. Über humoral Übertragbarkeit der Herznerwirkung. *Pflugers Archives Physiologie*, v.189: 239-242. 1921.

RINGER, S. Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *Journal of Physiology*, v.3: 380-393. 1882.

ROCHA E SILVA, M. *Fundamentos de Farmacologia e suas aplicações à Terapêutica*, v.1. São Paulo: EDART-São Paulo Livraria Editora Ltda, 1973.

SAWAYA, P. Sobre o veneno das glândulas cutâneas, a secreção e o coração de *Siphonops annulatus*. *Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Zoologia*, v.4, n.19: 206-270. 1940.

STANNIUS, H.F. Zwei Reihen physiologischer Versuche. *Müller's Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medizin*, v.1852: 85-100. 1852.

TRUEB, L. Bones, Frogs and Evolution. In: VIAL, J.L. (org.) *Evolutionary Biology of the Anurans*. Columbia: University of Missouri Press, 1973. p.65-132.

WALKER, W.F. & HOMBERGER, D.G. *Vertebrate Dissection*. Florida: Saunders College Publishing. 1992. 459p.

WYNEKEN, J. *The Anatomy of Sea Turtles*. U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, 2001. 172p.

YAPP, W.B. *Vertebrates: their structure and life*. New York: Oxford University Press, 1965. 319p.