

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Curso de Manipulação de Animais de Laboratório



Organização: Fabienne Petitinga de Paiva

Vitor Valério Maffili

Ana Carla Sampaio Santos

Salvador - BA

Mai - 2005

1. Introdução

A pesquisa científica contribui com ponderável parcela para o bem estar do homem e dos animais, entretanto, os conhecimentos da biologia nem sempre podem ser obtidos somente pela observação e pelo registro daquilo que normalmente acontece e, por isso, a experimentação científica é absolutamente necessária para que o ciclo do conhecimento se complete e se renove.

O uso de animais com objetivos científicos é uma prática comum, mas para que seja moralmente aceitável e apresente resultados confiáveis, é fundamental ter-se a consciência de que o animal, como ser vivo, possui hábitos de vida próprios da sua espécie, apresenta memória, preserva o instinto de sobrevivência e é sensível a angústia e à dor, razões que preconizam posturas éticas em todos os momentos do desenvolvimento dos estudos com animais de experimentação.

Não é de hoje que a preocupação com a ética na experimentação animal, a questão dos direitos dos animais e a sua utilização em pesquisas vêm sendo discutidos. Entretanto, a controvérsia permanece até os dias atuais, não existindo consenso quanto a posição que os animais ocupam em relação aos humanos. De forma geral, o questionamento entre os defensores e os contrários à utilização dos animais se baseavam nas semelhanças e ou diferenças existentes entre nós humanos e os animais de laboratório. Por outro lado, o filósofo Jeremy Bentham em 1789, levou a discussão para outro campo, onde segundo este autor a questão não se baseava no fato de eles poderem raciocinar ou mesmo pensar e sim:

Podem eles sofrer ?

2. Cuidado com os animais, uma questão histórica

O questionamento quanto à utilização de animais para as mais diversas atividades é um fato antigo, Pitágoras (582-500 aC) acreditava que a amabilidade para com todas as criaturas não-humanas era um dever.

A utilização de modelos animais em pesquisas vem sendo realizada desde a Antigüidade. Neste período, Hipócrates (450 aC) já relacionava o aspecto de órgãos humanos doentes com o de animais, com finalidade claramente didática.

Galeno (129-210 dC), em Roma, foi talvez o primeiro a realizar vivissecção com objetivos experimentais, ou seja, testar variáveis por meio de alterações provocadas nos animais.

Acredita-se que a primeira pesquisa científica que utilizou animais sistematicamente tenha sido a realizada por William Harvey, em 1638, sob a forma de livro, com o título "Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus".

A publicação do livro "A Origem das Espécies" de Charles Darwin, em 1859, estabeleceu os pressupostos do vínculo existente entre as diferentes espécies animais num único processo evolutivo. Desta forma, a teoria de Darwin possibilitou a extrapolação dos dados obtidos em pesquisas com modelos animais para seres humanos.

Um importante episódio para o estabelecimento de limites à utilização de animais em experimentação e ensino foi o que envolveu a esposa e a filha de Claude Bernard. O grande fisiologista utilizou, ao redor do ano de 1860, o cachorro de estimação da sua filha para dar aula aos seus alunos. Em resposta a este ato, a sua esposa fundou a primeira associação para a defesa dos animais de laboratório. A partir desta deu-se início a criação de inúmeras sociedades protetoras de animais, bem como, leis que tratam especificamente da utilização de animais de laboratório em pesquisas.

Claude Bernard, em seu livro "An Introduction to the Study of Experimental Medicine", publicado em 1865, justificava a utilização de animais em pesquisas, alegando que: "Nós temos o direito de fazer experimentos animais e vivissecção? Eu penso que temos este direito, total e absolutamente. Seria estranho se reconhecêssemos o direito de usar os animais para serviços caseiros, para a alimentação e proibir o seu uso para a instrução em uma das ciências mais úteis para a humanidade. Nenhuma hesitação é possível; a ciência da vida pode ser estabelecida somente através de experimentos, e nós podemos salvar seres vivos da morte somente após sacrificar outros".

Durante muitos anos as pesquisas que utilizam modelos animais sofreram poucos questionamentos, devido ao seu alto impacto social, tais como as que possibilitaram o desenvolvimento das vacinas contra raiva, tétano e difteria. Por outro lado, neste mesmo período surgiram inúmeras sociedades de proteção aos animais.

Em 1959, o zoologista William M.S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch publicaram um livro, onde estabeleceram os três "Rs" da pesquisa em animais: *Replace*

(substitua), *Reduce* (reduza) e *Refine* (refine). Tal proposta não impede a utilização de modelos animais em experimentação, mas realiza uma adequação no sentido de humanizá-la.

Graças ao professor Peter Singer em seu livro "Animal Liberation", publicado em 1975, houve o ressurgimento do debate sobre a utilização de animais em pesquisas e em outras atividades tais como as realizadas em abatedouros, indústrias de cosméticos, criação e transporte. Tal livro causou uma polêmica mundial, principalmente no tocante aos relatos das condições a que os animais eram submetidos pela indústria de cosméticos e no processo de produção de alimentos.

No Brasil, ainda hoje, não existe uma legislação que efetivamente regulamente a utilização de animais para fins didáticos e de pesquisa. Esta lacuna interfere de forma contundente na conduta ética dos profissionais envolvidos em experimentação e ainda agride o próprio bem-estar dos animais. Contudo, graças ao bom senso dos professores, pesquisadores e alunos têm-se adotado nos centros de pesquisas princípios éticos fundamentais e imprescindíveis visando as boas práticas na experimentação animal.

4. Diretrizes básicas para a utilização de animais em experimentos científicos

A possibilidade de generalização dos conhecimentos obtidos em animais não deve justificar todo e qualquer experimento. Deve ficar claro que não são todos os conhecimentos gerados em animais plenamente extrapoláveis para o ser humano, existem idiosincrasias que devem ser continuamente lembradas.

A pesquisa em animais, assim como toda e qualquer proposta de investigação científica, deve sempre ser avaliada por meio de três grandes critérios: geração de conhecimento, exeqüibilidade e relevância.

A geração de conhecimentos é inerente ao ato de pesquisar, é a sua justificativa básica e finalidade. Este critério ganha ainda mais importância na perspectiva de que o conhecimento é sempre reconstruído, e não apenas acumulado.

A exeqüibilidade, habitualmente, é o critério mais detalhado no processo de avaliação. A avaliação dos aspectos metodológicos e éticos pode ser feita de forma seqüencial ou conjunta. Contudo, a avaliação metodológica não pode ser dissociada da ética, pois ambas estão intrinsecamente relacionadas. Uma inadequação metodológica

implica em uma inadequação ética, pois o conhecimento gerado poderá estar incorreto ou sequer haver a geração de qualquer conhecimento novo.

O critério da relevância da pesquisa é o mais difícil de ser avaliado, pois implica em uma análise de valor agregado e não apenas de método ou conhecimento.

Os Comitês de ética em Pesquisa existem justamente para realizar a avaliação adequada dos projetos de pesquisa. Estes comitês são a garantia de que a sociedade exerce algum controle sobre as atividades de pesquisa.

A avaliação dos projetos de pesquisa em animais deve ter o mesmo rigor que a realizada em seres humanos. Os animais utilizados devem merecer todo o cuidado e atenção. A antiga e famosa proposta dos três R's da experimentação animal, feita por Russel e Burch, na metade do século passado, era constituída pelas possibilidades de substituir (replace), reduzir (reduce) e refinar (refine) a utilização destes modelos em pesquisa.

- **Replace** - A substituição de animais já avançou muito. Inúmeras alternativas já são utilizadas, tais como o uso de culturas de células, de modelos matemáticos e simuladores, entre outros.
- **Reduce** - A redução do número de animais utilizados nos experimentos pode ser obtida de maneira bastante simples e rápida. Os Comitês responsáveis pela avaliação devem exigir que os pesquisadores apresentem o cálculo de tamanho da amostra que irão utilizar no projeto. Quando não for possível realizar este cálculo o pesquisador deverá apresentar uma estimativa do número de animais. Este questionamento tem reduzido sensivelmente o número de animais utilizados, além de aprimorar o aspecto metodológico do projeto.
- **Refine** - O refinamento dos projetos de pesquisa acarreta um aprimoramento metodológico e ético dos mesmos. Os experimentos devem ser melhor planejados e as instalações devem ser adequadas. O aspecto mais importante deste item deve ser o relacionado ao questionamento dos deveres dos pesquisadores para com os animais de experimentação. Os animais merecem serem tratados de forma que tenham criação, manutenção e manejo adequados, não sofram estresse, dor ou outros sofrimentos desnecessários e tenham morte adequada. Os pesquisadores devem ser capacitados para fazerem pesquisa em animais dentro desta perspectiva.

4. Manipulação dos animais

O animal de laboratório deve ser visto como um reagente biológico. Tudo o que o circunda, de uma ou outra forma, pode exercer influência nas características desse reagente. Esta interferência reflete-se principalmente na resposta do animal a determinados experimentos. A manutenção de condições ambientais estáveis, portanto, irá assegurar a reprodução dos resultados experimentais, uma vez que resultados diferentes poderão ser obtidos para idênticos parâmetros experimentais com animais em diferentes condições ambientais.

4.1. Espaço destinado aos animais

As gaiolas utilizadas na experimentação com animais convencionais de laboratório tendem a manter dimensões padronizadas. No Biotério do CPqGM trabalha-se basicamente com dois tamanhos de caixa, uma pequena e duas grandes nos formatos retangular e quadrado. Na Tabela 1 encontra-se descrito as dimensões das caixas, bem como, o número máximo por caixa.

As gaiolas ainda podem ser providas de filtros que visam proteger os animais, especificamente os imunodeficientes, ou o operador no caso de infecção por agentes potencialmente patogênicos. Estas gaiolas são os chamados micro ou mini-isoladores.

Tabela 1. Número de animais por caixa para as diferentes espécies animais.

Tipo de caixa	Dimensões CxLxA*	Número de animais			
		Camundongo	Hamster	Rato Jovem	Rato Adulto
Pequena	30x20x13	5	-	-	-
Grande Retangular	49x34x16	20	10	8	4
Grande quadrada	41x34x16	20	10	8	4

* comprimento x largura x altura em centímetros

4.2. Ruídos

A maioria dos animais, incluindo os de laboratórios, ouve sons em frequências superiores ou inferiores aquelas audíveis pelos homens, os denominados ultra e infra-sons. Sabe-se também que os animais podem se adaptar de forma satisfatória a ruídos que são contínuos. Contudo, ruídos inesperados ou alterações nas intensidades de sons, como conversas em demasia no Biotério de Experimentação, podem provocar estresse e alterações imunológicas e metabólicas que podem influenciar sobremaneira os resultados das pesquisas.

4.3. Contenção dos animais

O método utilizado para a contenção dos animais de laboratório é dependente do comportamento, conformação física e tamanho de cada espécie. A maioria dos roedores possui cauda e esta pode ser utilizada para suspender o animal, desde que se trate de uma manobra rápida e cuidadosa, em que ele seja prontamente colocado em uma superfície de apoio, para que seja evitado o desconforto. Quando este tipo de contenção é adotado, deve ser realizada pela base da cauda para prevenir que ocorram fraturas, divulsão da pele e conseqüentes ferimentos, além disso, tal manobra dificulta que, devido a sua agilidade, o animal se vire e morda o operador.

4.3.1. Camundongos

Para a contenção do camundongo, a manobra inicial consiste em sua retirada da gaiola, suspendendo o animal pela base da cauda, e a seguir, deve-se, rapidamente apoiá-lo em uma superfície na qual ele possa se agarrar, como por exemplo, a tampa da gaiola. A utilização da tampa da gaiola como ponto de apoio para o camundongo favorece ao animal que nela se agarra e nos dá mais firmeza para a realização de contenções posteriores. A contenção de camundongos por pequenas distâncias, para a sexagem ou para a administração de drogas deve ser realizada mediante a sua colocação sobre a tampa da gaiola. Devemos pressioná-lo levemente sobre ela, segurando, primeiramente a pele da região dorso-cervical, entre os dedos indicador e polegar. Em seguida devemos fixar sua cauda entre os outros dedos e a palma da mão, para a limitação total de seus movimentos.

4.3.2. Ratos

Filhotes de ratos podem ser manipulados de maneira similar aos camundongos. Ratos maiores devem ser contidos firmemente, porém de forma gentil, colocando-se a mão firmemente sobre o dorso e a caixa torácica. A cabeça pode ser segura com o polegar e o indicador, imediatamente atrás da mandíbula.

4.3.3. Hamsters

A contenção de hamsters é uma prática fácil, pois apesar de sua agressividade, adapta-se rapidamente ao manejo, tornando-se um animal muito dócil. Para manuseá-lo é importante assegurar que o animal não esteja dormindo, pois ao acordar assustado, pode morder o operador. Ao entrar em contato com pessoas estranhas ou mesmo um outro indivíduo de sua espécie, o hamster assustado com o novo contato, pode ranger os dentes, emitir vocalizações e assumir a posição vertical, o que parece estar mais associado a um mecanismo de defesa do que a um comportamento agressivo.

Várias manobras são realizadas para conter um hamster. Para ser transportado de uma gaiola para outra podemos envolvê-lo com ambas as mãos, formando uma espécie de concha, dentro da qual o animal fica retido seguramente. Outro modo seria envolvê-lo com apenas uma das mãos ao redor de seu corpo, principalmente na altura do tórax. O hamster repousado em decúbito dorsal na palma da mão, com a exposição da sua região ventral, apresenta um comportamento tranquilo. Como sua pele é extremamente frouxa, ainda podemos contê-lo erguendo-o pela pele do dorso na altura do pescoço, sempre com o cuidado de promover movimentos firmes, mas de modo gentil.

Para a administração de drogas por via oral ou para injeções intraperitoneal e subcutânea, pegamos o máximo de pele de todo o dorso do animal, cuidando para que se promova uma contenção mais firme na altura do pescoço, para evitar que o animal vire-se e morda.

No hamster, assim como em camundongos e ratos, injeções subcutâneas são realizadas na região dorso-lateral, na altura do gradil costal, ou na região da nuca.

4.3.4. Coelhos

A contenção de coelhos deve ser realizada por técnicos bem treinados, e deve evitar que o animal se movimente, pois enquanto ele se debate, pode ferir-se. Fraturas de coluna vertebral são freqüentemente identificadas em animais recentemente manipulados. Devido a contensões inseguras, com desconforto e dor, os coelhos podem arranhar o operador.

Para ser retirado de sua gaiola ou para transporte a curtas distâncias, o coelho pode ser suspenso pela pele da região cervical, enquanto que com a outra mão, sustentamos os membros posteriores. A orelha deve ser mantida junto da pele, mas não deve sofrer nenhuma força de contenção. Com essa manobra podemos sentar o animal, apoiando-o sobre uma superfície, para que seja possível a sexagem.

5. Vias e locais de administração de drogas

Todos os animais devem ser corretamente imobilizados para que a administração das injeções seja conduzida sem risco para o pesquisador ou animal. Considerando que qualquer fator externo pode alterar a homeostase, e ainda ser apontado como um fator estressante, é fundamental que se aguarde tempo suficiente para que o animal se adapte a manipulação e torne-se familiarizado com o pesquisador. A manipulação incorreta ou brusca pode implicar estresse e, conseqüentemente, desequilíbrio de funções orgânicas, o que determina a ocorrência de alterações fisiológicas.

Os procedimentos recomendados para a administração de substâncias aos animais são descritos a seguir:

5.1. Via oral (VO) e gavage

A substância é introduzida na cavidade oral ou no aparelho digestório por meio de um tubo esofágico ou estomacal. Para a maioria das espécies, um tubo flexível (ou agulha) com a ponta arredondada é introduzido na boca do animal e gentilmente empurrado pelo esôfago até o estômago. É necessário ser cauteloso para assegurar que o tubo não tenha penetrado inadvertidamente a traquéia. Os tubos utilizados para camundongos (4cm) são menores do que para os ratos (8cm de comprimento). O volume máximo para roedores é de 1mL de solução para cada 100g de peso corporal, no entanto, se a administração for de solução aquosa, o volume pode ser de até 2mL para cada 100g de peso corporal. Deve-se

lembrar que os roedores ingerem alimento e água muitas vezes ao dia, e por isso dificilmente estão com o estômago vazio. A distensão máxima do estômago se dá no final do período escuro, em contrapartida à quantidade mínima no final do período claro. Nesse sentido, pequenos volumes devem ser administrados no início do período claro (fase de repouso).

5.2. *Subcutânea (SC)*

É a injeção de solução sob a pele do animal, a qual deve ser levantada antes da aplicação. É realizada com agulha hipodérmica curta (normalmente 25x5 mm ou mais fina), passando apenas pela derme, o mais próximo da superfície, formando uma pápula após a administração da substância. As áreas dorsolaterais do pescoço, ombro e flancos são as regiões de escolha. É uma via que raramente induz dor e é realizada em animais conscientes. Antes de injetar a substância, deve-se aspirar exercendo uma leve pressão no êmbolo da seringa para assegurar que a agulha não esteja penetrando em um vaso sanguíneo.

5.3. *Intramuscular (IM)*



A substância é injetada no músculo esquelético na forma de soluções oleosas ou suspensões. Os músculos de grande superfície, como os da porção posterior dos membros posteriores, são as regiões mais utilizadas. Devem ser usadas agulhas de tamanho similar às empregadas nas injeções subcutâneas e a profundidade no tecido deve ser de aproximadamente 5mm. Estruturas ósseas, nervos e vasos sanguíneos devem ser evitados. Antes de injetar deve-se assegurar que a agulha não está em um vaso sanguíneo, exercendo uma leve pressão de retirada no êmbolo da seringa. O tamanho da agulha é geralmente 25x5 ou 25x7mm ou mais fina, e o volume máximo, de 0,5mL por sítio de administração em ratos e hamster e de 0,3 em camundongos. Na Tabela 2 encontra-se um resumo com as principais vias de administração e volumes recomendados.

5.4. *Endovenosa*

A administração é feita diretamente na corrente sanguínea, por meio de vasos superficiais. As soluções a serem aplicadas não devem ser irritantes e o veículo deve ser do

tipo aquoso. A veia da cauda é o vaso sanguíneo de escolha em camundongos não-anestesiados; entretanto, sua perfuração requer habilidade e prática. O movimento do animal também pode ser contido dentro de um pequeno recipiente para facilitar a administração. A visualização da veia é facilitada por procedimentos como a imersão da cauda em água quente a 40-50°C por alguns segundos ou proximidade de uma lâmpada quente.

Obs. 1: nunca se deve aplicar medicamentos diluídos em veículo oleoso, sob pena de causar êmbolos no animal com a conseqüente morte do mesmo.

Obs. 2: vários dispositivos foram desenvolvidos para facilitar injeções endovenosas junto à veia lateral da cauda, alguns dos quais são obtidos comercialmente. Basicamente, estes dispositivos consistem de um cilindro transparente, de diâmetro apropriado, com divisor de comprimento ajustável, com uma fenda para exteriorização da cauda.

5.4. Intraperitoneal

A via intraperitoneal é normalmente a mais utilizada na experimentação com roedores. A substância é injetada na cavidade peritoneal entre os órgãos abdominais. Normalmente, injeta-se na metade posterior do abdome com o animal contido pelo dorso. O tamanho das agulhas normalmente utilizado é de 25x5 ou 25x7 mm. A imobilização adequada é pré-requisito básico para o sucesso deste tipo de aplicação.

Tabela 2. Vias e locais de administração de drogas, volume máximo recomendado para injeção e dimensão máxima de agulhas para cada espécie

Espécies	Subcutânea	Intramuscular	Intraperitoneal	Intravenosa
Camundongo	Nuca 2 a 3 ml agulha 25X5	Quadríceps e parte posterior da coxa 0,3 ml 25X5	2 a 3 ml 25X5	lateral da cauda 0,2 ml, 25X5
Rato	Nuca, dorso 5 a 10 ml agulha 25X5	Quadríceps e parte posterior da coxa 0,5 ml 25X5 e 25X7	5 a 10 ml 25X5 e 25X7	Dorsal do pênis, lateral da cauda 0,5 ml, 25X5
Hamster	Nuca 3 a 4 ml agulha 25X5	Quadríceps e parte posterior da coxa 0,5ml 25X5	3 a 4 ml 25X5	Femoral, jugular 0,3 ml, 25X5
Coelho	Nuca, Flanco 30 a 50 ml agulha 25X7	Quadríceps e parte posterior da coxa 2,0 ml 25X5 e 25X7	50 a 100 ml 25X7	Marginal da orelha 1 a 5 ml, 25X5

Obs: O estímulo luminoso produz variações nos níveis hormonais dos animais, assim, o ciclo reprodutivo de muitas espécies é controlado pelo ritmo circadiano imposto ao animal. Uma determinada dose de uma droga aplicada em diferentes horários do dia produz efeitos diferentes. Logo, o horário para a realização de um experimento deve ser sempre específico e mantido durante todo o experimento.

6. Técnicas anestésicas em animais de laboratório

O animal de laboratório, freqüentemente utilizado como material de pesquisa que envolve procedimentos cirúrgicos diversos, necessita, por questões de melhor manejo e acima de tudo humanitárias, ser submetido à anestesia. A anestesia deve ser realizada sempre que o procedimento implique em dor ou desconforto dos animais. Não serão necessários anestésicos, analgésicos ou tranqüilizantes quando isto não ocorre, como em procedimentos que incluem administração de fluidos, imunização, medicação oral, coleta de sangue (exceto intracardíaca e periorbital).

Para minimizar a dor e o desconforto devem ser utilizadas drogas anestésicas, analgésicas, tranqüilizantes e ainda a eutanásia. Alguns procedimentos que envolvem dor e requerem anestesia incluem: cirurgias, agentes que envolvem inflamação excessiva e necrose e coleta de sangue pelas vias intracardíaca e periorbital.

Alterações substanciais no estado de alerta, padrão respiratório do animal, presença de secreções nasais ou oculares e diarreia podem sinalizar a ocorrência de anormalidades. Uma vez detectada a alteração, o procedimento experimental deve ser adiado e a causa identificada.

6.1. Monitoramento da anestesia

A profundidade anestésica deve ser avaliada por meio da presença ou ausência de determinados sinais como reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e das alterações das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), que sofrem modificações de acordo com os planos atingidos (profundidade da anestesia).

6.2. Anestésicos comumente utilizados em animais de laboratório

6.2.1. Ratos

Tabela 3. Fármacos que podem ser utilizados como medicação pré-anestésica para ratos

Fármaco	Dose e via de administração
diazepan ou midazolam	2 mg/Kg IV; 4 mg/Kg IM/IP
acepromazina	1 mg/Kg IM
Quetamina	25 mg/Kg IM
Xilazina	1 a 3 mg/Kg/IM
atropina	0,05 mg/Kg SC/IP

Técnicas anestésicas sugeridas:

- Xilazina 5 a 10 mg/Kg + 50 a 75 mg/Kg Quetamina misturadas na mesma seringa IP

Período de latência	Período hábil
2 a 5 min	30 min

- Pentobarbital* 30 a 40 mg/Kg IP

Período de latência	Período hábil
2 a 5 min	60 a 80 min

- Tiopental* 25 mg/Kg IV

Período de latência	Período hábil
15 a 20 seg	5 a 10 min

* A utilização prévia de acepromazina, xilazina, midazolam ou diazepam reduz à metade as doses acima mencionadas de pentobarbital e tiopental.

- Fentanil-droperidol 2 ml/Kg IM

Período de latência	Período hábil
2 min	30 min

- Tiletamina-zolazepan 20 a 30 mg/Kg IM

Período de latência	Período hábil
2 min	20 a 40 min

6.2.2. Camundongos

Tabela 4. Fármacos que podem ser utilizados como medicação pré-anestésica para camundongos

Fármaco	Dose e via de administração
diazepam	5 mg/Kg IP
atropina	0,04 mg/Kg SC/IP/IM
clorpromazina	25 a 40 mg/Kg IM

Técnicas anestésicas sugeridas:

- Xilazina 10 a 15 mg/Kg + 100 a 150 mg/Kg Quetamina misturadas na mesma seringa IP

Período de latência	Período hábil
5 min	60 a 100 min

- Pentobarbital 60 mg/Kg IP

Período de latência	Período hábil
2 a 5 min	120 min

- Tiopental 40 a 80 mg/Kg IP

Período de latência	Período hábil
5 min	60 min

- Fentanil-droperidol 0,2 a 0,5 ml/ Kg IP + Diazepan 5 mg/ Kg IP

Período de latência	Período hábil
5 a 7 min	30 a 60 min

- Tiletamina-zolazepan 20 a 30 mg/Kg IM

Período de latência	Período hábil
2 min	20 a 40 min

6.2.3. Hamsters

Tabela 5. Fármacos que podem ser utilizados como medicação pré-anestésica para hamsters

Fármaco	Dose e via de administração
diazepan	5 mg/Kg IP
atropina	0,04 mg/Kg SC/IP/IM

Técnicas anestésicas sugeridas:

- Xilazina 10 mg/Kg + 200 mg/Kg Quetamina misturadas na mesma seringa IP

Período de latência	Período hábil
2 a 5 min	80 min

- Fentanil-droperidol 1,2 ml/100 g IM

Período de latência	Período hábil
5 a 7 min	60 min

- Tiletamina-zolazepan 15 a 20 mg/Kg IM

Período de latência	Período hábil
2 min	20 a 40 min

Obs: Os barbitúricos não são indicados nesta espécie em razão da alta taxa de mortalidade.

6.2.4. Coelhos

Tabela 7. Fármacos que podem ser utilizados como medicação pré-anestésica para coelhos

Fármaco	Dose e via de administração
diazepan	5 mg/Kg IP
Clorpromazina	7,5 mg/Kg IV; 25 a 100 mg/Kg IM*
quetamina	50 mg/Kg IM
acepromazina	1 mg/Kg IM
atropina	1 a 3 mg/Kg SC/IM

* Por esta via pode haver necrose tecidual.

Técnicas anestésicas sugeridas:

- Xilazina 5 a 10 mg/Kg + 35 a 50 mg/Kg Quetamina misturadas na mesma seringa IM

Período de latência	Período hábil
2 a 5 min	90 min

- Acepromazina 1 mg/Kg IV ou xilazina 5 mg/Kg IM ou diazepam 5 mg/Kg, associado com quetamina 50 mg/Kg IM

Período de latência	Período hábil
5 min	30 a 40 min

- Diazepam 5 mg/Kg IM e quetamina 25 mg/Kg IM administrados em seringas diferentes. Moderados sedação e grau de analgesia.
- Pentobarbital 37 mg/Kg IP
- Tiopental 10 mg/Kg IV
- Fentanil-droperidol 0,2 mg/Kg IM

- Tiletamina-zolazepam 5 a 10 mg/Kg IM

Período de latência	Período hábil
5 min	30 min

- Tiletamina-zolazepam 0,3 mg/Kg IM + Fentanil-droperidol 0,4 ml/Kg IM

Período de latência	Período hábil
5 min	40 a 60 min

Tabela 8. Agentes utilizados em anestesia: princípio ativo, nome comercial, laboratório e apresentação

Princípio ativo	Nome comercial	Laboratório	Apresentação
Acepromazina	Acepran 0,2 %	Univet	2,0 mg/ml
Atropina	Sulfato de atropina	Apset	0,25 mg/ml
Clorpromazina	Amplictil	Rhodia	25 mg/ 5ml
Diazepam	Valium	Roche	5 mg/ml
Fentanil	Fentanil	Johnson & Johnson	0,05 mg/ml
Fentanil-droperidol	Inoval	Johnson & Johnson	
Halotano	Halotano	Hoescht	Frascos 50, 100 e 250 ml
Levomepromazina	Neozine	Rhodia	25 mg/ 5ml
Meperidina	Dolantina	Hoescht	50 mg/ml
Metoxiflurano	Pentrane	Abbott	Frasco 100 ml
Midazolam	Dormonid	Roche	15mg/3ml
Pentobarbital	Hypnol	Cristália	30 mg/ml
Quetamina	Ketalar	Parke-Davis	50 mg/ml
Tiletamina-zolazepam	Zoletil	Virbac	50 mg/ml
Tiopental	Thionembutal	Abbott	0,5 e 1,0 g
Xilazina	Rompum	Bayer	20 mg/ml

Alternativas para a anestesia de outras espécies de animais

Tabela 9. Drogas e dosagens para anestesia em cães.

Droga	Dosagem (mg/kg)	Via	Período hábil
Quetamina / Xilazina	5 + 1-2	IV ou IM	30 a 60 min
Propofol	5 a 7,5 , mantendo com 0,2 a 0,4 mg/kg/min	IV	5 a 10 min com a dose inicial
Tiopental*	10 a 18	IV	5 a 15 min
Pentobarbital*	20 a 30	IV	30 a 40 min

* O uso da Acepromazina (0,05 a 1 mg/kg IM) como pré-anestésico leva a uma indução anestésica e à recuperação mais suaves, além de reduzir a quantidade necessária de barbitúrico em até 50%.

7. Cuidados com os animais no pós-cirúrgico

Uma vez concluído o procedimento cirúrgico, os animais devem ser colocados isoladamente em suas gaiolas para a recuperação anestésica. Este local deve ser silencioso e com pouca luz, evitando-se estressar os animais, com um mínimo de manipulação. A temperatura do ambiente deve variar de 27 a 30 °C para adultos e 35 a 37°C para os neonatos. Uma vez restabelecidos os parâmetros normais, a temperatura pode ser reduzida para 25 °C para adultos e 35 °C para neonatos. **Os camundongos são mais sensíveis a hipotermia que as demais espécies.**

A cama de proteção do fundo da gaiola não deve permitir o contato do paciente com resíduos tais como poeira e quaisquer detritos que possam se aderir aos olhos, nariz ou boca do animal e a recuperação de coelhos e cobaias não deve ser realizada em gaiolas gradeadas, sob risco de ocorrência de fraturas

O consumo de água no período pós-operatório está diminuído, devendo-se monitorar atentamente a ingestão de líquidos. Se o grau de desidratação for importante, a administração de fluidos deve ser iniciada pela via oral, subcutânea ou intraperitoneal, utilizando-se solução fisiológica ou glicofisiológica.

A administração de analgésicos no período pós-operatório deve ser considerada, ficando a escolha do medicamento a critério do pesquisador.

Tabela 11. Antiinflamatórios e analgésicos para camundongos

Fármaco	Dose e via de administração	Frequência
Acetaminophen	300 mg / Kg PO; 700 mg / 25g PO	A cada 4 h
Butorphanol	1-5 mg / Kg SC	A cada 6 h
Ácido acetil salicílico (AAS)	120 mg / Kg PO	A cada 4 h
Dexametazona	0,06 mg / 25 g SC IM IV IP	-
Prednisona	0,05-0,22 mg / 25 g SC IM	-

Tabela 12. Antiinflamatórios e analgésicos para ratos

Fármaco	Dose e via de administração	Frequência
Acetaminophen	110 – 300 mg/Kg PO; 25-75 mg/250 g	A cada 4 h
Butorphanol	0,05-2 mg/Kg SC; 0,012-0,5 mg/250 g	A cada 4 h
AAS	100 mg / Kg PO; 2,5 mg/250 g	A cada 4 h
Dexametazona	0,5-2,0 mg/Kg PO SC	A cada 12 h
Prednisona	0,05-0,22 mg SC IM	-

Tabela 13. Analgésicos para coelhos

Fármaco	Dose e via de administração	Frequência
Buprenorfina	0,01 a 0,05 mg/Kg SC, IM, IV	A cada 8 a 12 h
Butorphanol	0,05-2,0 mg/Kg SC, IM	A cada 4 h
Nalbuphina	1-2 mg?Kg IM, SC, IV	A cada 4-5 h

8. Eutanásia

Por definição, eutanásia é uma forma de abreviar-se a vida de um ser vivo, sem dor ou sofrimento. Os critérios primários para a eutanásia em termos de bem-estar animal são:

- Utilização de métodos sem dor;
- Os animais devem atingir rápido estado de inconsciência e morte;
- Requerer um mínimo de contenção, e evitar a excitabilidade do animal;
- Adequado para a idade e estado de saúde do animal em questão
- Causar um mínimo de sofrimento e estresse;
- Simples de administrar (em pequenas doses, se possível);
- Seguro para o operador e tanto quanto possível, esteticamente aceitável para este;
- Deve ser realizada distante de outros animais.

A eutanásia é realizada por várias razões, são elas:

- Término do experimento;
- Obtenção de material como sangue e outros tecidos para fins científicos;
- Quando os níveis de estresse, dor e sofrimento estão excedendo o previsto;
- Quando os animais não estão mais aptos à reprodução;
- Animais apresentando características não desejáveis ao biotério.

8.1. Confirmação da morte

Indicativos de morte são a ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos. Entretanto, a morte deve ser confirmada por sangria, remoção do coração, evisceração, congelamento ou decapitação antes do descarte dos cadáveres.

8.1.1. Métodos físicos: Não são métodos aceitos sem contestação. Devem ser utilizados somente quando não puderem ser utilizados métodos químicos.

a) Deslocamento cervical: Comumente utilizado em roedores com menos de 150 g. Deve ser evitado em hamsters e cobaias, devido ao pescoço curto, musculatura forte e pele solta na região do pescoço e ombros, o que dificulta a realização adequada da técnica. Roedores maiores devem ser sedados antes do deslocamento. Trata-se de uma manobra rápida, que em frações de segundos leva o animal a perda total de sensibilidade devido ao rompimento da medula espinhal e a morte. **É indicado somente quando a adoção de outros métodos possa invalidar o resultado final de determinado experimento e só deve ser realizada por pessoal treinado.** Para roedores de laboratório, o animal deve ser apoiado sobre uma superfície na qual ele possa se agarrar, propiciando maior firmeza na realização da eutanásia. O deslocamento cervical consiste em segurar a cauda do animal com uma das mãos (pela base) e com a outra apoiar uma pinça cirúrgica, ou objeto similar, transversalmente sobre sua região cervical. A seguir, pressiona-se firmemente a pinça para baixo e para frente, empurrando a cabeça do animal, enquanto que, simultaneamente, traciona-se a cauda em sentido oposto, para trás. Durante alguns segundos pode-se ainda detectar alguma atividade muscular, todavia tratam-se de movimentos reflexos, pois a perda total de sensação dolorosa e a morte são imediatas.

b) Decapitação: Anestesia prévia não é recomendada, uma vez que envolve maior manipulação e mais estresse para o animal. Outros métodos para a eutanásia são mais aceitáveis. Deve ser utilizado material específico como a guilhotina. Vale salientar que o sangue coletado após a decapitação frequentemente apresenta-se contaminado por secreções salivares e respiratórias.

c) Congelamento rápido: É realizado colocando-se o animal rapidamente no nitrogênio líquido. Deve ser utilizado **somente** para fetos e pequenos neonatos (< 4g). Animais maiores não morrerão imediatamente.

d) Exsanguinação: É realizada por meio de punção cardíaca ou de vasos sanguíneos de grande calibre, é frequentemente utilizada para a obtenção de soro hiperimune de roedores e coelhos, os quais devem ser previamente sedados ou anestesiados, pois pode-se observar inquietação associada a hipovolemia.

8.1.2. Métodos químicos:

São métodos mais estéticos por não causarem trauma aparente ao animal e são realizados por meio do uso de agentes farmacológicos inalantes e não-inalantes.

a) Agentes inalantes:

- Anestésicos voláteis como éter e clorofórmio: O roedor é colocado em uma câmara, com gaze ou algodão embebido com anestésico. O estado líquido desses anestésicos é irritante, deve-se cuidar para que os animais não entrem em contato com o produto químico. **O clorofórmio apresenta efeitos tóxicos para o fígado, rins e gônadas masculinas dos animais e é carcinogênico para humanos. O éter é irritante para as mucosas e em altas concentrações pode ser estressante para os animais. Adicionalmente, o éter é perigoso para o operador em virtude de suas propriedades explosivas. Não são métodos aceitos para a eutanásia.**
- Halotano, Enflurano e Isoflurano: Atuam deprimindo os sistemas respiratório e cardiovascular. Induzem a anestesia e subsequente morte. São todos agentes aceitáveis quando utilizados com o equipamento apropriado, para evitar o desperdício e a contaminação do ambiente. São onerosos.

- Dióxido de carbono: Dos métodos de eutanásia por inalação, o CO₂ é o mais recomendado para pequenos roedores de laboratório, principalmente para grande quantidade de animais, pois é barato, não inflamável, não explosivo e seguro, desde que aplicado com equipamento apropriado. É recomendado o uso de 70% de CO₂ no oxigênio ou ar para a rápida perda de consciência, sem hipóxia. Isto resulta em rápida anestesia, seguida por morte, com efeitos reduzidos quanto à irritação das vias aéreas. 100% de CO₂ é recomendado para cobaias. Somente CO₂ disponível comercialmente em cilindros deve ser utilizado. Este gás tem rápida ação letal por provocar depressão do sistema nervoso central, mas ainda assim, após detecção de parada respiratória, recomenda-se manter os animais na câmara por mais 10 minutos, para confirmação de sua morte. O tempo utilizado para a eutanásia de animais jovens é maior que para animais adultos com a utilização deste método. Não é recomendado para neonatos.
- Monóxido de carbono: Embora este seja um método relativamente rápido e humano para ser utilizado em roedores, em virtude do perigo para o operador, deve ser utilizado com extremo cuidado. Deve ser utilizado somente o gás comercializado em cilindros e com o equipamento adequado. Os roedores devem ser colocados em contêineres previamente vaporizado com 6% de CO.

b) Agentes injetáveis:

Em animais onde há dificuldade em puncionar a veia, é preferível a injeção intraperitoneal. Entretanto, por esse método, o anestésico leva mais tempo para agir e pode causar irritação no peritônio. Injeções intracárdicas e intrapulmonares não devem ser realizadas, a menos que o animal esteja anestesiado.

- Pentobarbital sódico: Injetado via intravenosa ou intraperitoneal age rapidamente e é uma forma aceitável de eutanásia. As pessoas envolvidas devem ser treinadas no método de injeção. Esta droga pode causar irritação do peritônio, o que pode ser evitado pela diluição. **Para a realização da eutanásia é recomendada a utilização de três vezes a dose anestésica.** Para a eutanásia de ratos e hamsters o pentobarbital pode ser administrado por via intraperitoneal, na dose de 100 mg/Kg e

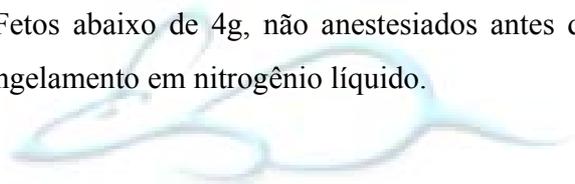
80-150 mg/Kg, respectivamente, enquanto que para coelhos é utilizado na dose de 200 mg/Kg, por via intravenosa.

- Quetamina: **Não é um método aceitável quando utilizada como droga única.** Quando em combinação com outras drogas (xilazina, benzodiazepínicos) é uma opção apropriada para a eutanásia.

Embriões

No momento em que o tubo neural desenvolve-se para um cérebro funcional (60% da gestação, em média), parece ser o momento no qual o feto passa a ter a percepção da dor e deve-se, portanto garantir procedimentos humanos de eutanásia.

No caso da remoção do feto de uma mãe anestesiada, na qual o feto também apresenta insensibilização, este pode ser morto por decapitação ou por remoção do coração. Entretanto, quando se pretende realizar a remoção dos fetos, uma grande quantidade de anestésico deve ser utilizada na mãe e mantido por prolongado período, para assegurar a passagem do anestésico pela placenta. Em muitos casos, anestésicos voláteis não anestésiam os fetos. Fetos abaixo de 4g, não anestesiados antes da remoção, podem ser mortos pelo rápido congelamento em nitrogênio líquido.



Neonatos

São os roedores até os 10 dias de idade. Em termos de estímulos de dor são mais semelhantes aos embriões que aos adultos. Podem ser mortos por decapitação ou por concussão. A hipotermia também pode ser utilizada. O dióxido de carbono não deve ser utilizado, uma vez que os neonatos são mais resistentes.

8.2. Métodos aceitáveis para roedores anestesiados ou não conscientes:

8.2.1. Congelamento rápido em nitrogênio líquido:

Deve ser utilizado somente em animais com menos de 4 g.

8.2.2. Exsanguinação:

Somente em animais previamente anestesiados.

8.2.3. Embolismo:

Somente em animais inconscientes, pode ser doloroso.

8.2.4. Cloreto de potássio:

É cardiotóxico e pode causar tosse, vocalização, espasmos musculares e convulsões. Deve ser utilizado somente em animais totalmente anestesiados.

8.3. Métodos não aceitáveis para a eutanásia de roedores:

8.3.1. Hipotermia:

Sob nenhuma circunstância um roedor deve ser morto colocando-o diretamente em um freezer. O congelamento em freezer deve ser utilizado somente para a garantia da morte, após a realização da eutanásia.

8.3.2. Nitrogênio:

Mata os animais por hipóxia, antes de causar inconsciência, o que o faz inaceitável. Ratos exibem sinais de pânico e estresse antes da inconsciência.

8.3.3. Óxido nítrico:

Mata por anoxia, é lento e os roedores demonstram sinais de aumento de atividade antes da morte, tornando-o inaceitável.

8.3.4. Ciclopropano:

Tem ação rápida em roedores, entretanto, não é seguro para o operador.

8.3.4. Éter e clorofórmio:

Não devem ser utilizados para a eutanásia de roedores, ambos são extremamente perigosos para o operador e causam irritação nas vias aéreas.

Tabela 14. Características dos métodos utilizados para eutanásia em roedores

Agente	Rapidez	Eficácia	Facilidade	Segurança para o operador	Valor anestésico	Avaliação (1-5)	Observações
Halotano, Isoflurano, Enflurano	++	++	++	+	++	5	Aceitável
Pentobarbital	++	++	+	+	++	5	Aceitável
Concussão	++	++	+	++	-	4	Animais Abaixo de 1 Kg
Deslocamento cervical	++	++	+	++	-	4	Animais Abaixo de 150 g
Dióxido de Carbono	+	++	++	++	++	4	Aceitável [] > 70%
Decapitação	+	+	+	++	-	2	Preferência Por Outros Métodos
Monóxido de carbono	+	+	+	++	-	2	Perigoso Para o Operador
Congelamento rápido	-	+	++	++	+	1	Somente em Pequenos Neonatos (<4g)

Rapidez: ++ muito rápido, + rápido, - vagaroso. **Eficácia:** ++ muito efetivo, + efetivo, - ineficiente. **Facilidade em utilizar:** ++ facilmente utilizável, + requer prática, - requer treinamento específico. **Segurança para o operador:** ++ sem perigo, + pouco perigo, - perigoso. **Valor anestésico:** ++ bom, + aceitável, - inaceitável para muitas pessoas. **Avaliação:** 1-5 com 5 sendo o mais recomendado. Fonte: Laboratory Animals (1997).

9. Referências bibliográficas:

BALLS, M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Laboratory Animals*, v.28, p.193-211, 1994.

CLOSE, B. et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory Animals*, v.30, p.293-316, 1996.

CLOSE, B. et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory Animals*, v.31, p.1-32, 1997.

FLECKNELL P.A. Refinement of animal use – assessment and alleviation of pain and distress. *Laboratory Animals*, v.28, p.222-231, 1994.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH 80-23).

HALL, L.W., CLARKE, K.W. *Veterinary anaesthesia*. 9ed. London: Ballière Tindall, 1991. 410p.

Manual para técnicos em bioterismo / editores Rosalia Regina de Luca, Sandra Regina Alexandre, Thais Marques, Nívea Lopes de Souza, José Luis Bernardino

Merusse, Silvânia Pires Neves, - São Paulo: Winner Graph, 1996.

Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório/ National Academic Press. ed.AAALAC e COBEA. 2003, 162p.

The animal welfare act – <http://algonet.se/~stifug/act-ordinance.html>, 1998.

10. Sites relacionados:

www.iacuc.org

www.nih.gov

www.cobea.org.br

www.fbresearch.org

<http://caat.jhsph.edu>

www.aalaslearninglibrary.org

Apêndice A

1- Classificação Geral dos Animais

Animal	Camundongo	Rato	Coelho	Hamster
Filo	Chordata	Chordata	Chordata	Chordata
Sub-filo	Vertebrata	Vertebrata	Vertebrata	Vertebrata
Classe	Mammalia	Mammalia	Mammalia	Mammalia
Ordem	Rodentia	Rodentia	Lagomorpha	Rodentia
Família	Muridae	Muridae	Ochotonidae	Cricitidae
Gênero	Mus	Rattus	Oryctolagus	Mesocricetus
Espécie	musculus	norvegicus	cuniculus	auratus

2- Características gerais

Animal	Camundongo	Rato	Coelho	Hamster
Peso ao nascimento	0,5 – 1g	5g	100g	2 – 3g
Peso ao desmame	9 – 11g	40 – 50g	800 – 1300g	20 – 30g
Peso macho adulto	20 – 40g	300 – 400g	3500 – 5400g	85 – 140g
Peso fêmea adulta	25 – 40g	200 – 300g	3900 – 6400g	95 – 120g
Nº de cromossomos	40	42	44	44
Temp. retal (°C)	37,4	38,2	39,5	36,2 – 37,5
Consumo de água médio/dia	3 a 7 ml	20 a 45 ml	-	8 a 10ml/100g de peso vivo
Consumo de ração médio/dia	4 a 5 g	12 a 15 g	-	10 a 12g/100g de peso vivo

3- Parâmetros cardiovasculares e respiratórios

Animal	Camundongo	Rato	Coelho	Hamster
Batimentos cardíacos/min	330 – 780	261 – 600	123 – 304	280 – 412
Movimentos respiratórios/min	84 – 230	66 – 114	38 – 60	33 - 127
Pressão arterial (S ¹ /D ²)	113/81	116/90	110/80	110/80

¹ sistólica

² diastólica

4- Valores hematológicos

Animal	Camundongo	Rato	Coelho	Hamster
Eritrócitos (milhões/mL)	7,7 – 12,5	7,2 – 9,6	4,5 – 7,0	7,5
Hemoglobina (mg/mL)	14,8	14,8	13,6	-
Hematócrito (ml/100mL)	41,5	46,0	41,5	-
pH do sangue	7,35	7,35	7,35	7,35
Tempo de coagulação (segundos)	14	20	60 – 360	-
Leucócitos (mil/mL)	8,0	14,0	9,0	-
Neutrófilos (%)	22,0	22,0	30,0 – 50,0	29,9
Eosinófilos (%)	2,0	2,0	1,0 – 3,0	1,1
Basófilos (%)	-	1,0	1,0 – 8,0	1,1
Linfócitos (%)	75,0	73,0	20,0 – 90,0	73,5
Monócitos (%)	1,0 – 2,0	2,0	6,0 – 30,0	2,5

5- Condições ambientais

Animal	Camundongo	Rato	Coelho	Hamster
Temperatura (°C)	20-24	20-24	15-21	20-24
Umidade (%)	55±10	55±10	55±10	55±10

6- Antecedentes reprodutivos

Animal	Camundongo	Rato	Coelho	Hamster
Ciclo estral (poliéstrico)	4 dias	4 – dias	15 – 16 dias	15 – 18 dias
Estro (horas)	12 – 14	9 – 20	*	6 – 10
Ovulação	2 – 3 horas	8 – 11 horas	**	-
Duração da gestação	19 – 21 dias	21 – 30 dias	30 – 35 dias	15 – 18 dias
Vida sexual útil	1 – 1,5 anos	1 ano	1 – 3 anos	14 meses
Puberdade do macho	Depois da quinta semana	50 – 70 dias	6 – 8 meses	6 – semanas
Puberdade da fêmea	5 – 8 semanas	35 – 80 dias	5 – 6 meses	6 – 8 semanas
Número de crias	5 - 12	4 – 10	1 – 13	4 - 12

* muito prolongado (1 mês), na ausência do macho

** provocada, horas após a cópula