



Procedimentos e Técnicas Experimentais Aplicados à Biotecnologia

Priscila M. M. de Leon
Prof^a, Dr^a., Médica Veterinária

Procedimentos e Técnicas Experimentais Aplicados à Biotecnologia

- **Contenção**
- **Coleta de sangue**
- **Aplicação medicamentosa**
- **Analgesia**
- **Anestesia**
- **Biópsia**
- **Cirurgias**
- **Eutanásia**
- **Necropsia**

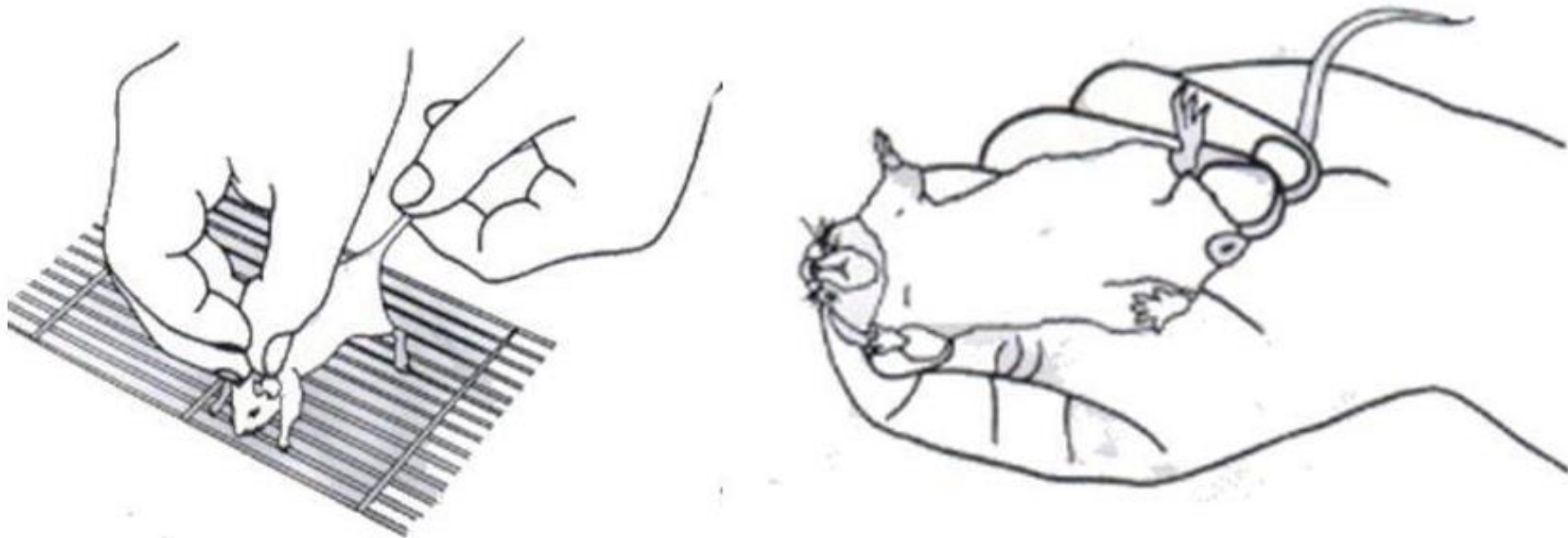


Procedimentos e Técnicas Experimentais Aplicados à Biotecnologia

➤ Contenção de Animais de Laboratório:

- 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 em uma **manobra rápida e cuidadosa**, colocando o animal em uma **superfície de apoio**
 - O procedimento deve ser realizado pela **base da cauda** para prevenir fraturas e ferimentos
 - Tal manobra dificulta que, devido a sua agilidade, o animal se vire e morda o operador.

Contenção de Animais de Laboratório



Contenção Coelhos



Contenção Ratos

Contenção Hamster



Vias de Aplicação de Medicamentos

- **1º Contenção**: todos os animais devem ser corretamente imobilizados para que a administração das injeções seja conduzida sem risco para o pesquisador ou animal
- **Fundamental**: é aguardar tempo suficiente para que o animal se adapte a manipulação e torne-se familiarizado com o pesquisador.
- Considerando que qualquer fator externo pode alterar a homeostase e ser um fator estressante

Procedimentos para a administração de substâncias:

- ✓ Via oral (VO) e Gavagem
- ✓ Subcutânea (SC)
- ✓ Intramuscular (IM)
- ✓ Endovenosa (EV)
- ✓ Intraperitoneal (IP)

Vias de Aplicação de Medicamentos

■ Via oral (VO) e Gavagem:



- Quando a substância deve ser **administrada via cavidade oral ou no aparelho digestório** por meio de um tubo esofágico ou estomacal.
- **Tubo flexível** (ou agulha) com a ponta arredondada é introduzido na boca do animal e gentilmente empurrado pelo esôfago até o estômago

- **Tubos:** camundongos (4cm) e ratos (8cm de comprimento)
- **Volume máximo:** para roedores é de **1mL de solução para cada 100g de peso corporal**. Quando solução aquosa o volume pode ser de até **2mL para cada 100g de peso corporal**.
- A distensão máxima do estômago se dá no final do período escuro e distensão mínima na final do período claro → **maiores volumes administrados ao fim do dia**



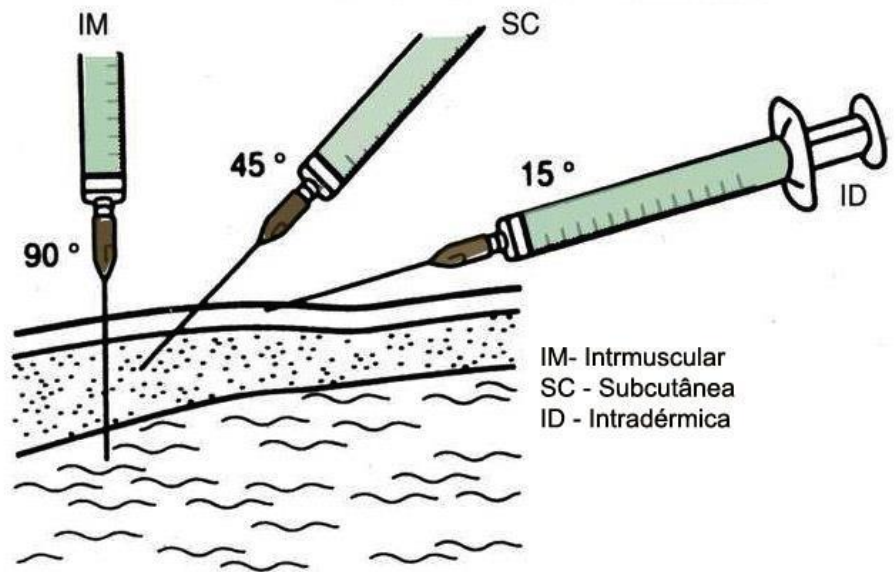
Vias de Aplicação de Medicamentos

■ Subcutânea (SC):




É a **injeção de solução sob a pele do animal**, a qual deve ser levantada antes da aplicação.

- **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
- **Agulha:** é realizada com agulha hipodérmica curta (normalmente 25 x 5mm ou mais fina)
- Ao administrar: passar apenas pela derme, o mais próximo da superfície, formando uma pápula após a administração da substância
- 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.**



Vias de Aplicação de Medicamentos

■ 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.

- **Agulhas:** similares às empregadas nas injeções SC
- **Profundidade:** aproximadamente 5mm.
- Antes de injetar deve-se assegurar que a agulha não está em um vaso sanguíneo
- **Volume Máximo:** de 0,5mL por sítio de administração em ratos e hamster e de 0,3 mL em camundongos.



Vias de Aplicação de Medicamentos

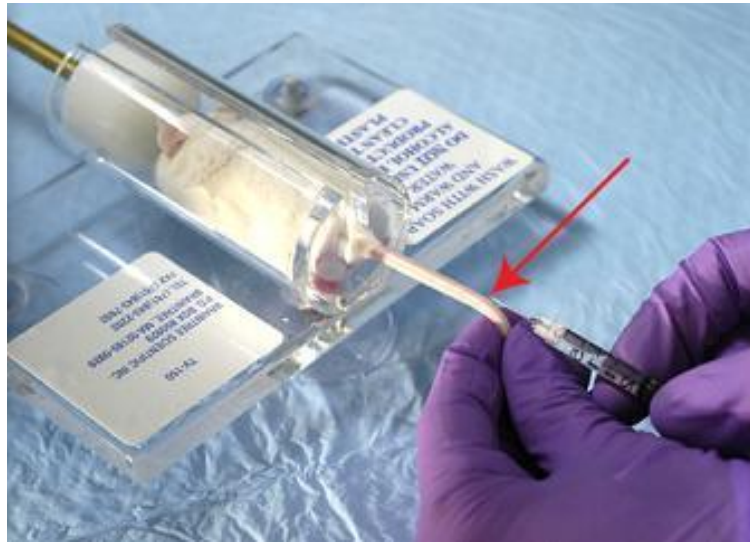
■ Endovenosa (EV):



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 lateral** é o vaso de escolha em camundongos e ratos

- **Contenção:** através de cilindro transparente, de diâmetro apropriado, com divisor de comprimento ajustável, com uma fenda para exteriorização da cauda.
- **Visualização da veia** pode ser facilitada por imersão da cauda em água quente a 40-50°C por alguns segundos
- **Importante:** nunca se deve aplicar medicamentos diluídos em veículo oleoso



Vias de Aplicação de Medicamentos

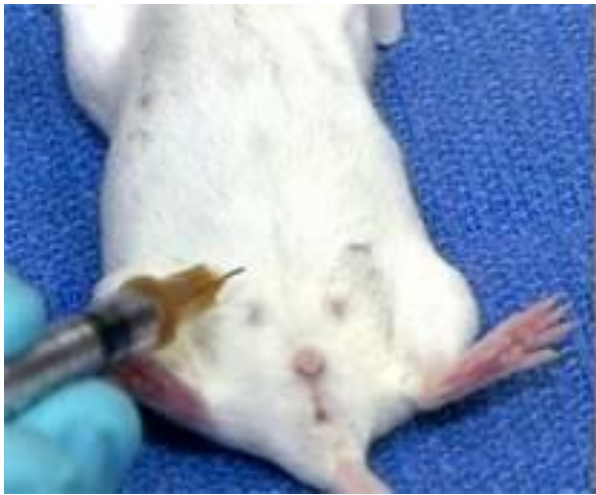
■ Intraperitoneal (IP):



A substância é injetada **na cavidade peritoneal** entre os órgãos abdominais;

➤ A via intraperitoneal **é a mais utilizada na experimentação com roedores (fácil e dificilmente causa irritação);**

- **Local:** injeta-se na metade posterior do abdome com o animal contido pelo dorso.
- **Agulha:** tamanho das agulhas normalmente utilizado é de 25x5 ou 25x7 mm
- **Contenção:** A imobilização adequada é pré-requisito básico para o sucesso deste tipo de aplicação



Vias de Aplicação de Medicamentos

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

- O horário para realização de um experimento deve ser sempre mantido → pois uma determinada dose de uma droga aplicada em diferentes horários do dia produz efeitos diferentes.

Ex.: A mesma dose de Fenobarbital em camundongo – dia mata / noite sobrevive

Coleta de Amostras Biológicas

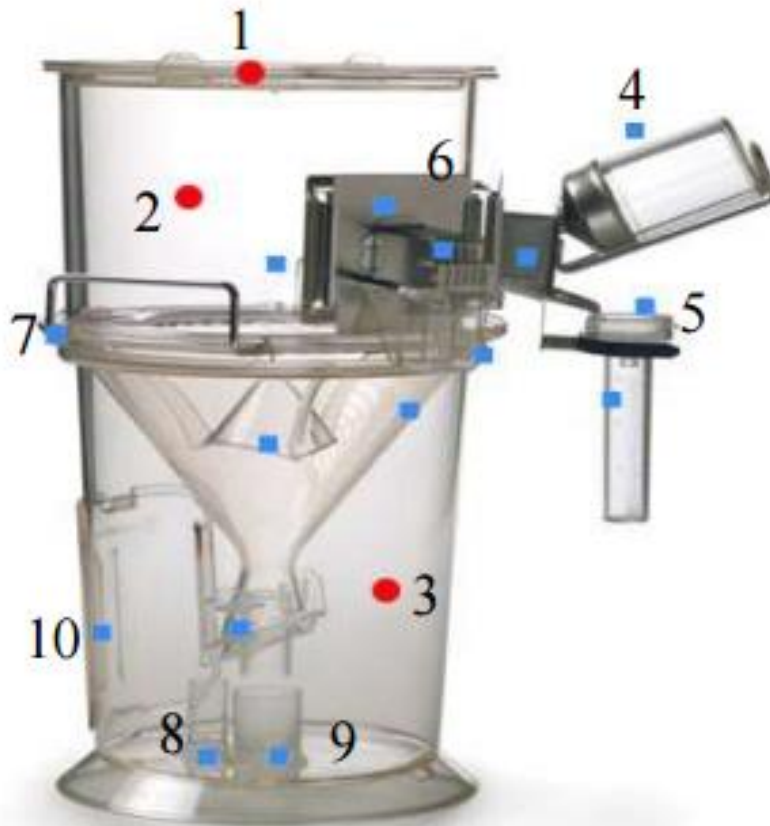
- **Sangue** } Invasiva
 - **Fezes** } Não Invasiva
 - **Urina** }
- ↔

As **gaiolas metabólicas** fornecem amostras para monitoramento metabólico acurado, permitem a separação de ração, água, fezes e urina.

Gaiolas Metabólicas



Gaiola Metabólica



- 1- tampa com respiro
- 2- espaço p/ animal
- 3- suporte individual
- 4- bebedouro
- 5- sobra de água
- 6- comedouro
- 7- piso grade
- 8- coletor de urina
- 9- coletor de fezes
- 10- acesso aos coletores

Possível de ser mantida em cabine de segurança biológica

Coleta de Sangue

- **Roedores:**

- sinus retro orbital
- veia jugular
- veia maxilar
- veia safena
- coração

- **Hamster:**

- veia cefálica

- **Coelhos:**

- veia marginal da orelha

Escolha da técnica depende de:

- ✓ **Espécie animal**
- ✓ **Volume de sangue coletado**
- ✓ **Tipo de análise**
- ✓ **Frequência de coleta**

Coleta de Sangue

TABELA 1 – PRINCIPAIS VIAS DE COLETA DE SANGUE EM ANIMAIS CONVENCIONAIS E NÃO CONVENCIONAIS EM EXPERIMENTAÇÃO.

	Veia Cava	Veia Cefálica	Veia Marginal da Orelha	Veia Femoral	Punção Cardíaca	Veia Jugular	Seio Orbital	Veia / Arteria Caudal	Corte na Cauda	Veia da Asa
Rato					X	X	X	X	X	
Camundongos					X		X	X	X	
Cobaia	X		X		X		X			
Coelho			X		X					
Hamster	X		X		X		X			
PNH				X		X				
Cão		X		X		X				
Gato		X		X		X				
Aves					X	X				X
Gambá						X		X		
Bovinos						X		X		
Pq. Ruminantes		X				X				
Furão					X	X		X	X	
Gerbil					X		X	X		
Porco	X		X							
Peixes					X				X	
Rã					X					
Serpentes					X					
Tartaruga					X				X	

Adaptado de “Manual sobre al cuidado y uso de los animales de experimentación”, do Conselho Canadense de Proteção aos Animais.

Coleta de Sangue

Volume sanguíneo total do camundongo é de 6 a 8% do seu peso corporal (6 a 8 mL de sangue por 100g de peso)

- Volumes até 0,1 mL - deve-se puncionar uma veia superficial. Em geral, não necessita anestesia
- Volumes acima de 0,1 mL - em animais menores, uma anestesia de curta duração pode ser necessária (se consegue coletar essas quantidades de sangue de animais maiores sem o uso de anestesia)

Coleta sem anestesia:

- Veia dorsal da pata
- Veia submandibular
- Veia safena

Coleta com anestesia:

- Veia caudal
- Punção cardíaca
- Sinus retro orbital

Coleta de Sangue

- **Ideal é intervalo de 2 semanas para coletas subsequentes**
 - Composição do sangue volte ao normal
 - Volume sanguíneo é recuperado em 24h - Reposição natural é 1mL / kg / dia
- * Com a reposição de fluido concomitante à coleta, poderá ser coletado maior volume de sangue.

Reposição de fluidos:

- Solução salina, Lactato, Solução de Ringer
- 40-80 ml / kg a cada 24 horas
- **Ratos de 200 g** : 5 ml por via subcutânea ou intraperitoneal
- **Camundongos de 20 g**: 1-2 ml por via subcutânea ou intraperitoneal

Coleta de Sangue

Table 5. Total blood volumes and recommended maximum blood sample volumes for species of given body weights

Species (weight)	Blood volume (ml)	7.5% (ml)	10% (ml)	15% (ml)	20% (ml)
Mouse (25 g)	1.8	0.1	0.2	0.3	0.4
Rat (250 g)	16	1.2	1.6	2.4	3.2
Rabbit (4 kg)	224	17	22	34	45
Dog (10 kg)	850	64	85	127	170
Macaque (Rhesus) (5 kg)	280	21	28	42	56
Macaque (Cynomolgus) (5 kg)	325	24	32	49	65
Marmoset (350 g)	25	2.0	2.5	3.5	5
Minipig (15 kg)	975	73	98	146	195

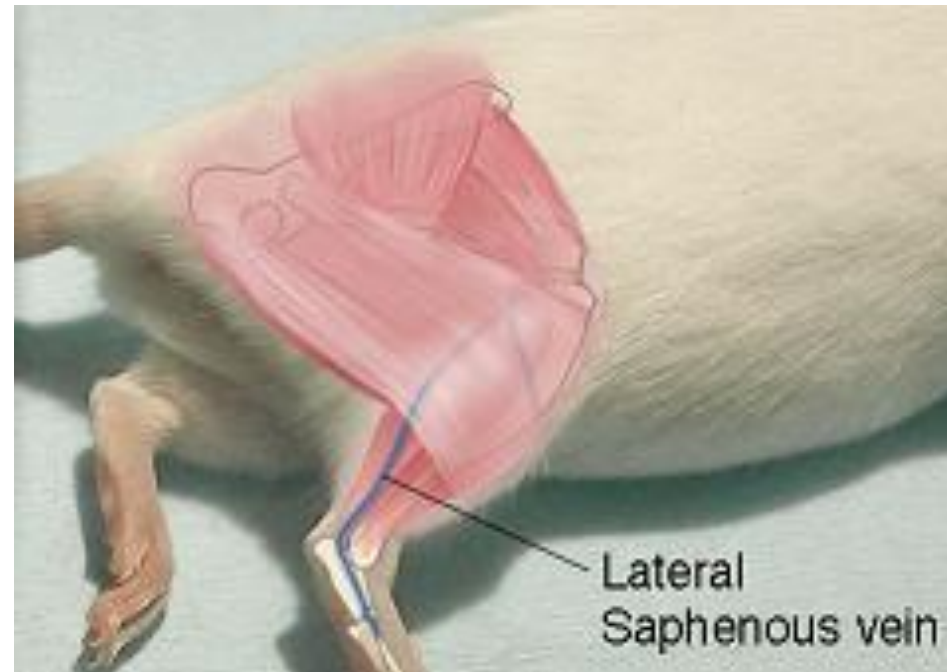
Table 4. Limit volumes and recovery periods

Single sampling (e.g. toxicity study)		Multiple sampling (e.g. toxicokinetic study)	
% Circulatory blood volume removed	Approximate recovery period	% Circulatory blood volume removed in 24 h	Approximate recovery period
7.5%	1 week	7.5%	1 week
10%	2 weeks	10–15%	2 weeks
15%	4 weeks	20%	3 weeks

Coleta de Sangue – *Veia Safena*

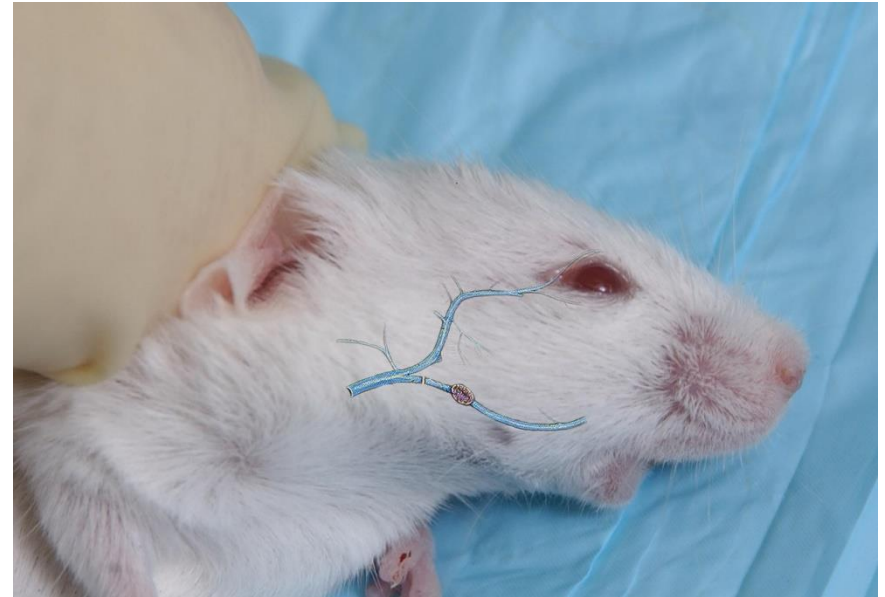
▪ Veia safena:

- Superfície externa da coxa do animal
- Pode ser repetida algumas vezes para coleta de pequenos volumes



Coleta de Sangue – *Veia submandibular*

- Veia submandibular ou maxilar:
 - Ou veia facial, fica na superfície lateral inferior da face
 - Pode ser repetida algumas vezes para coleta de pequenos volumes
 - Não é necessária anestesia



Coleta de Sangue – *Veia caudal*

▪ Veia da cauda:

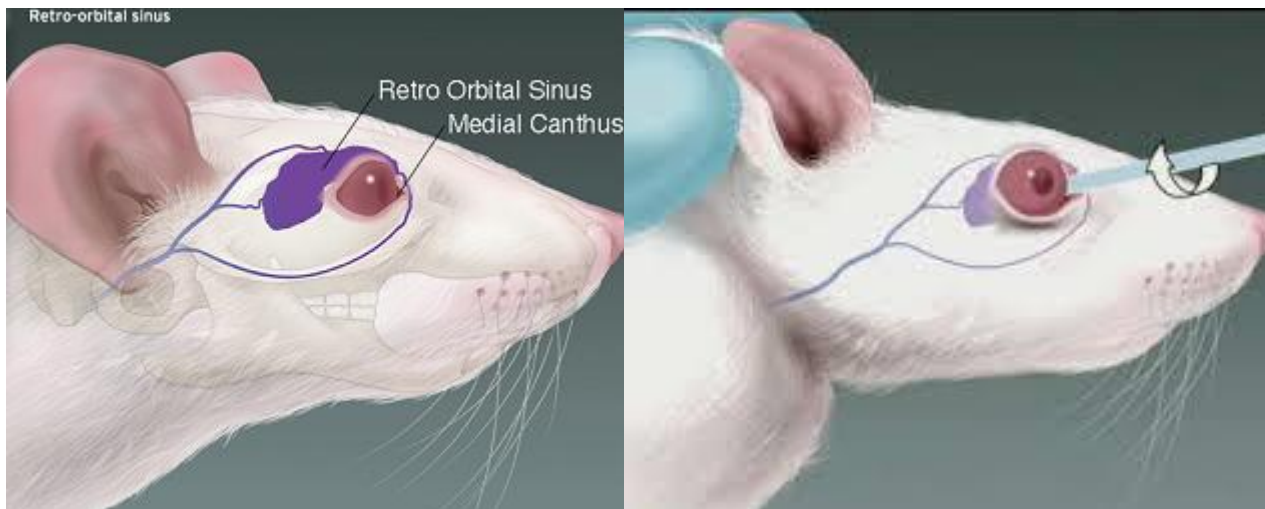
- Procedimento deve ser realizado sob anestesia
- Em ratos e camundongos pode ser facilitado mergulhando-se a cauda do animal por 10 seg. em água com temperatura de 40°C (vasodilatação).



Coleta de Sangue – *Sinus Retro Orbital*

▪ Sinus retro orbital:

- Deve ser realizado mediante a utilização de colírio anestésico (tetracaína) e por profissional treinado
- Existe risco de cegueira ou ulceração ocular se o procedimento for incorreto
- Coletado maior volume de sangue



Coleta de Sangue – Veia Jugular

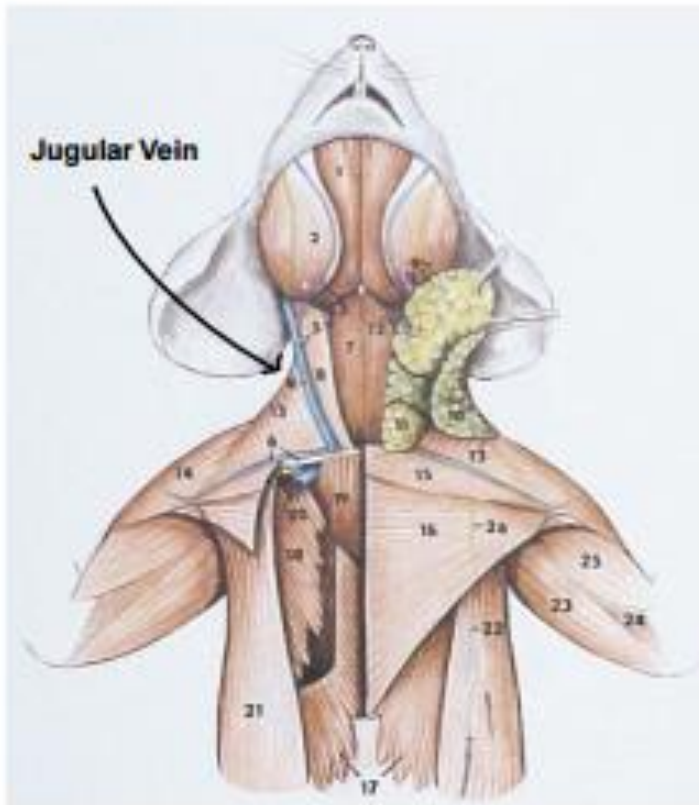


FIGURE 7. Location of the jugular vein in the mouse.

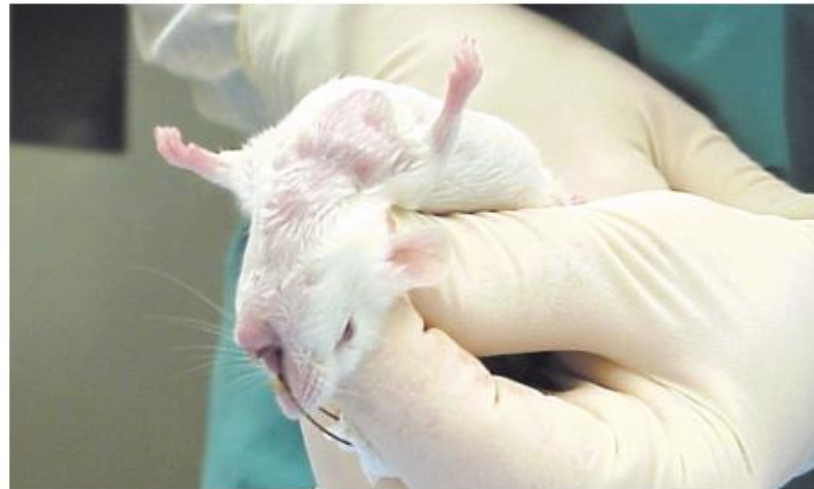


FIGURE 6. Proper positioning of mouse for blood collection from the jugular vein.

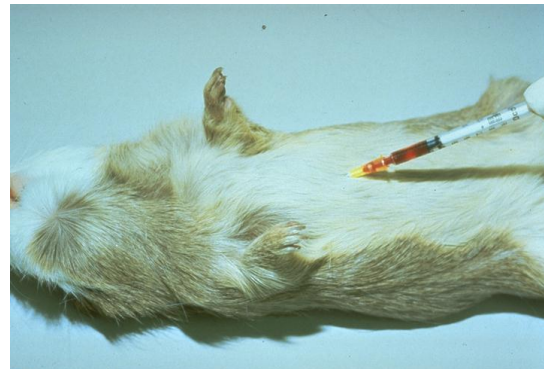


FIGURE 8. Blood collection from the jugular vein.

Coleta de Sangue – *Intracardiaca*

▪ Punção Cardíaca:

- De escolha quando necessário coletar grandes volumes de sangue
- Todas as espécies convencionais
- É uma coleta final – sacrifício após o procedimento (Exsanguinação)
- **Sob anestesia**
- **Agulha: 40 x 9 mm**



Coleta de Sangue – *Veia marginal da orelha*

▪ Veia Auricular:

- De escolha em coelhos
- Com o animal imobilizado em caixa de contenção
- Vasodilatação com luz infravermelha
- Assepsia com álcool 70%



ANALGESIA

➤ **O termo Analgesia é ausência de dor**

A dor é definida como uma experiência emocional e sensitiva desagradável associada com lesão de tecido, potencial ou real (Wolfenhson & Lloyd, 1994)



Nos animais a dor é avaliada indiretamente, por meio de **atitudes comportamentais e dados fisiológicos.**

“o sofrimento animal é equivalente ao sofrimento humano quando ambos forem sujeitos a um mesmo fator que induza à dor”

IMPORTANTE: a dor produz alterações fisiológicas que não só dificultam a recuperação do animal no pós-cirúrgico, como afeta os resultados experimentais e o bem-estar animal, afetando diretamente os resultados esperados.

▪ Respostas à dor:

✓ **Mudança de comportamento** consciente:

- **Estado mental** - se o animal está apático, deprimido, agressivo ou hiperexcitado - relacionando com seu comportamento habitual
- A atividade do animal pode variar de inatividade total até hiperatividade
- **Alterações no andar, na postura ou expressão facial**

✓ **Reflexo de retração ou de imobilidade** – resposta imediata

✓ **Comunicação com a colônia** - passa a experiência para outros do grupo assegurando a sobrevivência dos indivíduos (**vocalização ou da liberação de ferormônios**)

- A vocalização vai depender da espécie (variedade de sons). O som produzido pode estar fora do alcance da audição humana (ultra ou infrassom) e passar despercebido



Se for administrada uma droga analgésica, e a condição e o comportamento do animal melhorarem, este pode ser um diagnóstico útil para constatar a dor de animais

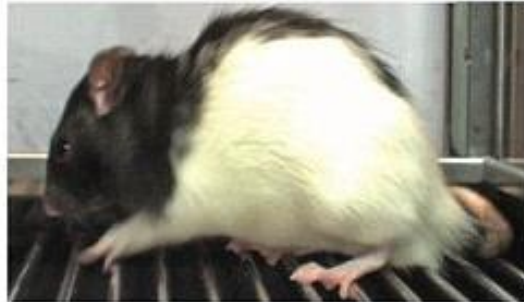
SENSIBILIDADE DE ÓRGÃOS E TECIDOS À DOR

- **Pele**- pode ser de alta intensidade
 - **Músculos** - raramente muito sensitivos - aumento com inflamações e isquemia
 - **Articulações e ossos**- relativamente insensitivos – aumento com processos inflamatórios e degenerativos
 - **Dentes e córnea**- entre os mais sensitivos (40-600 vezes mais que pele)
 - **Vísceras** - menos que a pele.
- * A sensibilidade pode ser altamente modificada por patologias ou procedimentos experimentais**

neutral expression



pain expression



❖ Dor aguda:

- Postura de guarda (tentativa de se proteger, fugir ou morder)
- Gritos
- Mutilação (lamber, morder, coçar)
- Inquietação (caminhar, deitar e levantar)
- Sudorese
- Deitar por longos períodos
- Relutância em se mover, dificuldade para levantar
- Posições anormais (cabeça para baixo, abdômen contraído)

❖ Dor crônica:

- Redução da atividade
- Perda do apetite
- Alterações da personalidade
- Esconder-se em um canto
- Recusa em se movimentar
- Alterações no urinar e defecar
- Falta de higiene pessoal
- Automutilação



Normal

Dor moderada

Dor severa

SINTOMAS DE DOR ESPECÍFICOS DAS ESPÉCIES

CAMUNDONGO - varia entre as linhagens:

- aumento do tempo de sono;
- perda de peso/desidratação;
- piloereção e postura encurvada;
- isolados do resto do grupo;
- gritam ao serem tocados.

HAMSTER:

- perda de peso;
- período maior de sono;
- aumento da agressividade ou depressão;
- diarreia.

COELHO:

- diminuição do consumo de água e alimento;
- olham para a parte de trás da gaiola;
- movimentos limitados;
- fotossensibilidade.

RATO:

- vocalização;
- perda de peso;
- piloereção/postura encurvada;
- hipotermia;
- descarga ocular;
- ato de lambar-se;
- maior agressividade.

COBAIA:

- vocalização;
- não resistem quando segurados;
- não respondem aos estímulos;
- sonolentos e sem agressividade.

➤ **Analgésicos durante e/ou após intervenções dolorosas devem fazer parte dos protocolos de experimentação.**

ANALGESIA

- Os analgésicos utilizados são de duas categorias:
 - ✓ **Opióides**: quando a dor for considerada **de moderada a severa**
 - **Morfina**: droga mais usada. Possui até 4h de duração de alívio da dor.
 - **Bruprenorfina**: é o analgésico de escolha para os animais de laboratório, ação de 8 a 12 h.
 - **Butorfanol**: analgésico sintético com potência 5x maior que a da morfina. O grau de sedação ocorre e a depressão respiratória atinge um efeito máximo que não aumenta com o aumento das doses. A analgesia dura de 2 a 5 h;
 - ✓ **Antinflamatórios Não Esteroides (AINES)**: são usados no controle da dor de **intensidade leve a moderada**
 - **Carprofeno e Cetoprofeno**: 30x mais potente que a aspirina. Não produzem ulceração gastrointestinal e são de longa duração (até 24 h).
 - **Flunixin meglumine**: maior efeito analgésico, usado para dores osteoartríticas.

É preciso reavaliar o quadro para saber se a dor foi controlada

Tabela 3- Analgésicos, doses e vias de inoculação para camundongos, ratos, coelhos e suínos (Extraído parcialmente de Use of Experimental Animals at Johns Hopkins University³¹)

Agente	Dose	Recomendação
CAMUNDONGOS		
Buprenorfina [Subutex®, Temgesic®]	0,05-0,15 mg/kg, SC cada 6-12h	Para dor discreta a moderada. Duração do efeito de 3-5 horas.
Butorfanol [Turbogesic®, Stadol®]	1,0-2,0 mg/kg SC cada 4h	Para dor moderada, analgesia menos efetiva com duração de 1-2 horas.
Sulfato de morfina [Dimorf®]	0.98 mg/kg SC 2-5 mg/gk IM, SC cada 4h	Para dor intensa.
RATOS		
Acetaminofenol [Tylenol®]	1-2 mg/ml na água do bebedouro	Para dor discreta.
Ácido acetil salicílico [Aspirina®, Melhoral®]	100-150 mg/kg oral	Para dor discreta, a cada 4 horas.
Buprenorfina	0,01-0,05 mg/kg SC 0,02-0,5 mg/kg SC, IP, IM	Para dor moderada. 8-10 horas de duração 6-12 horas de duração
Carprofeno [Rimadyl®]	5-10 mg/kg SC, oral	Para dor moderada.
Sulfato de morfina	2,5-5,0 mg/kg SC	Para dor intensa, 2-4 horas de duração.
COELHOS		
Buprenorfina	0,01-0,05 mg/kg SC, IV	Duração 6-12 horas. Recomendado para dor moderada.
Acetaminofenol	1 ml /100 ml na água do bebedouro	Recomendado para dor moderada
Sulfato de morfina	2-5 mg/kg SC ou IM	Duração 2-4 horas. Provoca potente analgesia com média sedação e depressão respiratória.
SUÍNOS		
Ácido acetil salicílico	10 mg/kg via oral	Para dor moderada, administrado com protetor estomacal. Pode ser administrado adicionado a xaropes adocicados.
Buprenorfina	0,01mg/kg IV cada 6 horas ou 0,02mg/kg IV cada 10h 0,005-0.1mg/kg cada 12h IM	Menos efetivo como analgésico em caso de inflamação, falência de órgãos ou doença sistêmica.
Fentanila	0,05mg/kg IM cada 2 horas 50-100 µg/kg/h IV	No mini-suíno deve-se usar a via transdermal.
Lidocaina e prilocaina creme	Tópico, aplicar 2 mm do creme na pele 45 minutos antes do procedimento.	Previne a dor associada com coleta de sangue e injeções intravenosas na orelha.
Cetoprofeno [Profenid®]	1-3mg/kg oral cada12h	Potente inibidor não seletivo das enzimas COX, bom analgésico e anti-inflamatório.

ANALGESIA em animais de laboratório



ANESTESIA

Uma anestesia bem conduzida é de fundamental importância para a validade científica de qualquer estudo que utilize animais

- **Eficiência e menor duração possível:** o animal deve se recuperar da anestesia e retornar a sua normalidade fisiológica tão rapidamente quanto possível.
- **Indicativos de anestesia mal conduzida:** dor, medo, inapetência, desconforto, hipotermia, hipóxia ou acidose respiratória

IMPORTANTE: não é necessário o jejum prévio em animais de laboratório antes da anestesia. Jejum é necessário apenas quando da cirurgia gastrointestinal.

→ **Roedores se tornam hipoglicêmicos muito rapidamente quando em jejum**



FIG. 2 – Manutenção anestésica de um coelho por meio de máscara facial.



FIG. 3 – Manutenção Anestésica em Cobaia com máscara e monitoração cardíaca por meio de eletrodos fixados na pele com agulhas.

MEDICAÇÃO PRÉ-ANESTÉSICA:

- reduzir o medo e a apreensão (indução livre de estresse)
- reduzir outros anestésicos da anestesia geral (menores efeitos colaterais)
- facilitar a recuperação da anestesia
- reduzir a dor pós-operatória

Drogas mais utilizadas: **anticolinérgicas, tranquilizantes e sedativos.**

Tabela 5 – Dosagem de medicações pré-anestésicas para ratos.

Fármaco	Dosagem
Acepromazina ²	2,5mg/kg IM, IP
Diazepam ²	2,5-5mg/kg /IP
Midazolam ²	5mg/kg IP
Medetomidina ^{2*}	30-100µg/kg SC , IP
Ketamina ^{2, 15*}	50-100 mg/kg IP – Pode causar aumento da pressão sanguínea.
Xilazina ²	1-5mg/kg IP/IM

ANESTESIA GERAL

A anestesia é uma combinação de narcose, relaxamento e analgesia

Anestesia bem balanceada: são administradas **drogas em combinação**, incluindo a **pré-medicação**, os **anestésicos** e os **analgésicos**, para poder se chegar a uma **melhor estabilidade fisiológica do animal** e **reduzir os efeitos colaterais**.

Escolha de protocolo anestésico:

- **Espécie animal**
- **Duração do procedimento**
- **Profundidade da anestesia**
- **Disponibilidade de equipamentos**

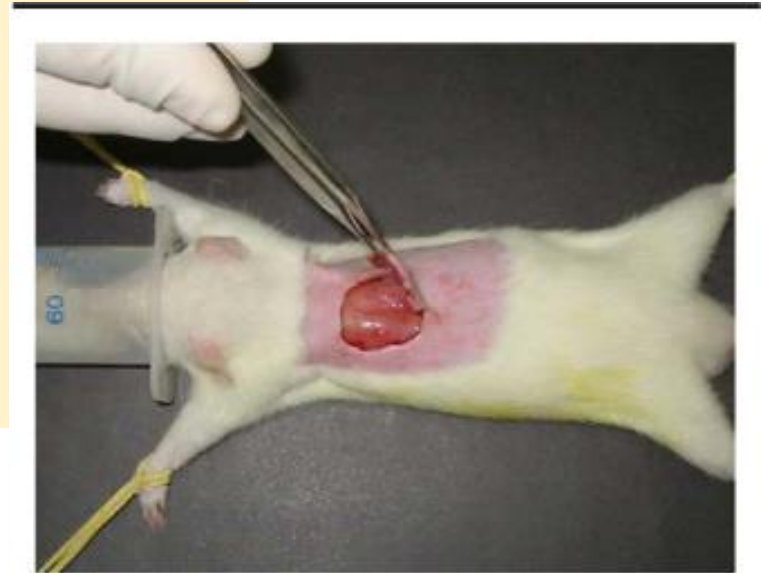


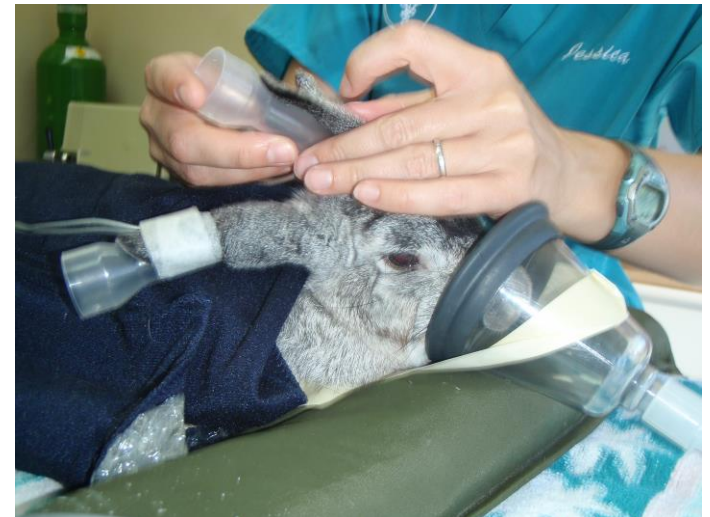
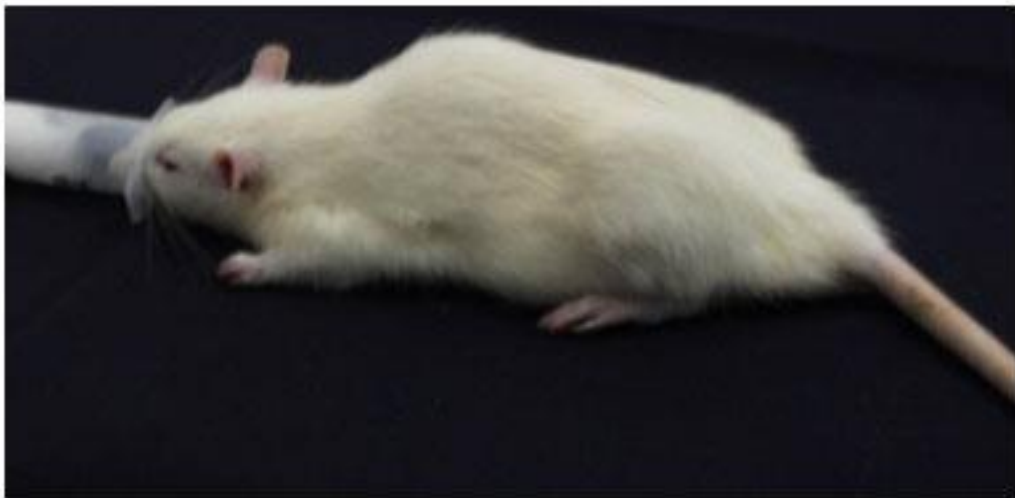
FIGURA 3 – Ato operatório, onde observa-se a exposição da fáscia muscular dorsal

➤ ANESTÉSICOS INALATÓRIOS

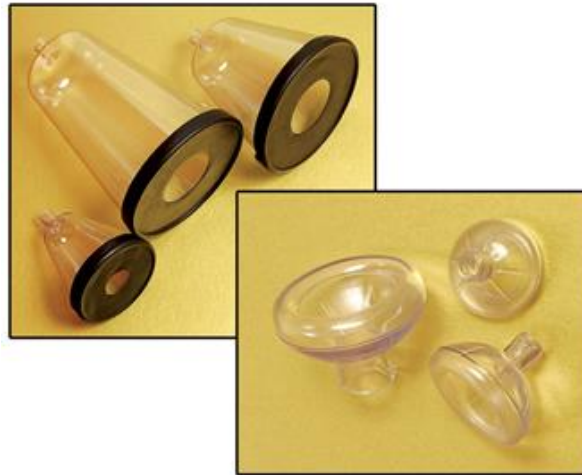
Os agentes voláteis devem ser administrados para os animais por meio de um aparelho para anestesia, usando oxigênio e óxido de nitrogênio como transportadores.

▪ **Equipamentos para anestesia: cilindros de gás, válvula de redução, medidor de fluxo, vaporizador.**

- ✓ **METOXIFLURANO** – produz indução e recuperação lentas. Isso significa grande segurança com **boa atividade analgésica**, que se prolonga pelo período pós-operatório;
- ✓ **HALOTANO** – largamente empregado. Não irritante para as membranas, **é o mais barato**. Podem ser notados tremores durante a recuperação.
- ✓ **ISOFLURANO** – mais seguro que o halotano, com **pouco efeito nas enzimas hepáticas**, porém, **bem mais caro**.



➤ ANESTÉSICOS INALATÓRIOS



Após uma anestesia prolongada, deverá ser dado oxigênio puro por 5 a 10 min, evitando hipóxia e um colapso respiratório.

➤ ANESTÉSICOS INJETÁVEIS

- Os agentes injetáveis são administrados ou por **via endovenosa ou parenteral**. Em animais de experimentação as vias mais utilizadas são **IM e IP**.
- A **absorção é lenta pelas vias intraperitoneal, subcutânea e intramuscular**. Também a **recuperação é lenta**, os efeitos residuais persistem por longos períodos.
- **Essas vias exigem doses mais altas da droga**
- **É necessário pesar o animal para calculo da dose anestésica**

Os animais devem ser **monitorados frequentemente** (cada 5 minutos ou mais), até que seja **atingida a profundidade certa da anestesia**.

- O **reflexo podal** é o mais comumente usado, além do da cauda ou da orelha.
- Os **sinais fisiológicos** devem ser monitorados: **batimentos cardíacos** (qualidade e o ritmo do pulso), **movimentos respiratórios** (padrão, a profundidade e o ritmo) e **temperatura**
- Os reflexos oculares são maus indicadores da profundidade da anestesia.

❖ **Hipotermia** é a causa mais comum de mortalidade em pequenos roedores - monitorar e tomar as medidas para prevenir a hipotermia

ANESTESIA GERAL

Tabela 6 - Dosagem de fármacos anestésicos utilizados em ratos.

Fármaco	Dosagem	Tempo de Duração	Indicação /Comentários
Isoflurano Halotano Enflurano*	3-4% indução 1-2% manutenção ⁷	Recuperação rápida após o término do fornecimento.	Ideal para experimentos toxicológicos, devido à baixa metabolização hepática e renal ¹¹ .
Isoflurano + morfina ¹⁵	Isoflurano a 2% Inalação Morfina 5mg/kg IP	Recuperação rápida após o término do fornecimento.	
Ketamina + Xilazina ^{13,7*}	60-90mg/kg (K) + 5-10mg/kg (X) IP	30-45 minutos duração. Suplementação com 1/3 da dose de Ketamina.	Essa associação gera hiperglicemia, decorrente do aumento da produção hepática e redução dos níveis de insulina. Aumento da Pressão intraocular; Redução da motilidade gastrointestinal; Bom relaxamento muscular bom plano anestésico. ¹¹
Ketamina + Diazepam ^{4*}	75mg/kg (K) + 5mg/kg (D) IP	20-30 minutos de anesthesia leve.	Associação recomendada para estudos recomendados que precisem mínima depressão respiratória e cardiovascular. Hiperacusia pode ocorrer em baixa dose.
Ketamina + Midazolan ^{4*}	75mg/kg (K) + 5mg/kg (M) IP	20-30 minutos de anesthesia leve.	
Ketamina + Xilazina+ Acepromazina*	40mg/kg (K) + 8mg/kg (X) + 4mg/kg (A) IP	25 minutos de anesthesia.	
Ketamina + propofol	40mg/kg (K) + 60mg/kg (P) IP	32 minutos de anesthesia cirúrgica	
Midazolam + Xilazina + Ketamina	3mg/kg (M) +3mg/kg(X) + 75mg/kg (K)	35-40 de anesthesia cirúrgica	
Pentobarbital*	20-40mg/kg IV 40-60/kg IP	45 minutos de anesthesia cirúrgica.	Potente indutor do sistema enzimático microsossomal hepático. Não é encontrado mais no Brasil ¹⁴ .
Propofol*	10mg/kg ^{4,15} 100mg/kg IP	A aplicação IP pode gerar 27 minutos de anesthesia cirúrgica.	
Thiopental*	20-40mg/kg IV 40mg/kg IP	5-10 minutos de anesthesia	
Tiletamina + Zolazepam ^{8*}	20-40mg/kg IP ⁵	Está associada a um tempo de recuperação prolongado, hipotermia severa e hiperacusia.	Observar que a dose é referente à mistura vendida. Não é recomendada para anestesia cirúrgica apenas para pequenos procedimentos como coleta de sangue e contensão química. ¹⁴

*Idealmente adicionar um opioide a esse protocolo ou medicação.

CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

- Todos os parâmetros monitorados durante a cirurgia devem continuar a ser monitorados no período pós-operatório.
- **Ideal: área específica para a recuperação**
- Verificar periodicamente:
 - calor e conforto;
 - depressão respiratória;
 - equilíbrio de fluidos;
 - perda sanguínea / perda plasmática
 - urina / fezes – se o animal não defecar paralisia do íleo;
 - peso corporal – excelente indicador da recuperação da cirurgia
 - consumo de água e alimento

CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Quadro 2: Valores fisiológicos de camundongo, rato, cobaio e coelho.

	Camundongo	Rato	<u>Cobaio</u>	Coelho
Peso corpóreo (g)	25-40	300-500	700-1200	2.000-6.000
Temperatura corporal (°C)	37.5	38	38	38
Frequência respiratória (mov.min ⁻¹)	80-200	70-115	50-140	40-60
Frequência cardíaca (bat.min ⁻¹)	350-600	250-350	150-250	135-325

EUTANÁSIA

➤ Eutanásia significa morte sem dor ou sofrimento

Requisitos para técnicas de eutanásia:

- **humanitária**, não causando terror ou sofrimento ao animal;
- **não impressionar ou sensibilizar** quem executa ou assiste;
- ter um tempo mínimo para a **perda da consciência**;
- **não produzir alterações** que prejudiquem a interpretação das lesões;
- ser um **método de fácil aplicação**, ação rápida e baixo custo;
- **evitar contaminações** que possam propiciar disseminação de doenças infectocontagiosas ou contaminação das amostras biológicas;
- **não oferecer perigo** ao profissional que o execute.

❖ Executado por profissional habilitado/técnicos treinados

❖ É obrigatória a participação do Médico Veterinário como responsável

Compromisso do pesquisador → evitar o sofrimento, minimizar o desconforto e dor

EUTANÁSIA

O local onde se realizará a eutanásia deve ser afastado e separado de salas ou alojamentos de outros animais:

→ animais emitem sinais de perigo (sons, ferormônios e cheiro a sangue)

→ gerando estresse na colônia

Sintomas de ansiedade e medo:

vocalização angustiada; agitação; ações defensivas; tentativas de fuga; tremores musculares; dilatação da pupila; salivação intensa; micção e defecação involuntárias; sudorese e aumento das frequências respiratória e cardíaca.

A eutanásia pode/deve ser empregada nos animais:

- ao final do experimento
- doentes
- fora do padrão genético e/ou sanitário
- mutilados devido a brigas
- com defeitos físicos
- no final da vida reprodutiva
- idosos
- quando proliferam em excesso.

MÉTODOS DE EUTANÁSIA

▪ FÍSICOS

- **DESLOCAMENTO CERVICAL** – praticados em camundongos, ratos e outras espécies pequenas. É um procedimento rápido que consiste no rompimento da medula espinhal do animal e consequente perda total de sensibilidade e morte.
- **DECAPITAÇÃO** – praticado em camundongos, ratos e outras espécies pequenas. É uma prática esteticamente desagradável. Realizada com o auxílio de guilhotina. Provoca a morte instantânea com imediata perda de reflexos e nivelamento da eletroencefalografia. Vale salientar que o sangue coletado após a decapitação apresenta-se frequentemente contaminado.
- **EXANGUINAÇÃO** – praticado em roedores e coelhos. Os animais devem ser previamente anestesiados. A técnica consiste em realizar uma punção cardíaca ou de vasos sanguíneos de grande calibre até se obter a sangria total.
- **TIRO POR ARMA DE FOGO** - animais não-convencionais de laboratório, como: cães, gatos, primatas não-humanos e outras de médio e grande porte

MÉTODOS DE EUTANÁSIA

▪ QUÍMICOS:

- **ANESTÉSICOS INALANTES** – incluem o **halotano** e o **metoxiflurano**. O halotano e o metoxiflurano são muito caros e exigem equipamento apropriado na sua aplicação para evitar desperdício e contaminação do ambiente. *éter e clorofórmio não devem ser utilizados
- **GASES NÃO-ANESTÉSICOS** – incluem o monóxido e o dióxido de carbono, o nitrogênio e o cianeto.
- **PENTOBARBITAL SÓDICO E DERIVADOS** – são os mais utilizados e constituem o melhor método de eutanásia. A via de administração de eleição é a endovenosa porque proporciona a morte do animal mais rapidamente (via IP verifica-se um retardo de tempo do efeito anestésico). Recomenda-se o dobro ou o triplo da dose anestésica para se obter êxito total na prática.
- **HIDRATO DE CLORAL E CETAMINA** – ambos são anestésicos dissociativos. A cetamina tem excelente resultado quando combinada com xilazina e os benzodiazepínicos.

MÉTODOS DE EUTANÁSIA

Quadro 1 – Eutanásia: métodos físicos

ANIMAL	DESLOCAMENTO CERVICAL	TRAUMATISMO CRANIANO	DECAPITAÇÃO	TIRO DE ARMA DE FOGO	ELETROCUSSÃO	EXANGUINAÇÃO
Camundongo	A	NR	A	NR	NR	A
Rato	A	A	A	NR	NR	A
<i>Hamster</i>	A	NR	A	NR	NR	A
Cobaia	A	A	NR	NR	NR	A
Coelho	NR	A	A	NR	NR	A
Gerbil	A	NR	A	NR	NR	NR
Gato	NR	NR	NR	NR	NR	A
Cão	NR	NR	NR	A	A	A
Ovino	NR	A	NR	A	A	A
Caprino	NR	A	NR	A	A	A
Suíno	NR	NR	NR	A	A	A
Macaco	A*	NR	A*	NR	NR	A
Pombo	A	NR	A	NR	NR	NR
Aves Domésticas	A	NR	A	NR	A	A

A – aceitável

NR – não recomendado

* Espécies de macaco de pequeno porte. Ex.: *calithrix*, *saimiri*.

Quadro 3 – Eutanásia: métodos químicos – agentes farmacológicos não-inalantes

ANIMAL	BARBITÚRICOS (OV)	VIA	HIDRATO DE CLORAL (OV)	VIA	CETAMINA (OV)	VIA
Camundongo	A	IP	NR		A	IM
Rato	A	IP	NR		A	IM
<i>Hamster</i>	A	IP	NR		A	IM
Cobaia	A	IP	NR		A	IM
Coelho	A	EV				
IP	A	EV	A	IM		
Gerbil	A	IP	NR		A	IM
Gato	A	EV				
IP	A	EV	A	IM		
Cão	A	EV				
IP	A	EV	A	IM		
Ovino	A	EV	A	EV	A	IM
Caprino	A	EV	A	EV	A	IM
Suíno	A	EV	A	EV	A	IM
Macaco	A	EV				
IP	A	EV	A	IM		
Pombo	A	IP	A	IP	A	IM
Aves domésticas	A	IP	A	IP	A	IM

A – aceitável

NR – não recomendado

OV – overdose

IP – intraperitoneal

EV – endovenosa

IM – intramuscular

Métodos inaceitáveis:

- Embolia Gasosa
- Traumatismo Craniano
- Incineração in vivo
- Hidrato de Cloral (pequenos animais)
- Clorofórmio
- Gás Cianídrico e Cianuretos
- Descompressão
- Afogamento
- Exsanguinação (sem sedação prévia)
- Imersão em Formol
- Bloqueadores Neuromusculares
- Estricnina

Métodos aceitos com restrição:

- Metoxiflurano
- N²
- Argônio
- deslocamento cervical (<200g)
- decapitação

Métodos recomendáveis:

- Barbitúricos
- anestésicos inaláveis
- CO²
- cloreto de potássio com anestesia geral prévia