

Capítulo: Procedimentos – Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica

Introdução

É essencial conhecer a biologia da espécie, raça, linhagem com a qual se trabalha, uma vez que as necessidades básicas (físicas, emocionais ou comportamentais) a serem satisfeitas não são as mesmas para todos os animais. Conceito aplicável aos animais geneticamente modificados, os quais podem apresentar necessidades especiais decorrentes da modificação genética.

Neste capítulo trataremos das seguintes espécies: camundongo, cobaia, coelho, hamster e rato.

Os roedores possuem organização social complexa; cada animal tem seu papel, e a simples retirada ou adição de um animal em uma gaiola, pode ter consequências consideráveis que afetarão o bem-estar de todo o grupo. Uma característica importante e que deve ser respeitada é de serem gregários. O isolamento, portanto, causa sofrimento e diminuição nos níveis de bem-estar. Quando o isolamento for necessário (por exemplo, em casos de agressividade, doenças ou protocolos de pesquisas), deve ser cientificamente justificado. Medidas mitigatórias do impacto do isolamento sobre o bem estar devem ser adotadas, como permear-se o contato visual, auditivo e olfatório entre animais congêneres, reduzindo o estresse da separação.

Faz-se necessário a definição de alguns ambientes que serão citados ao longo do capítulo:

Instalação animal – Instalação na qual são produzidos, mantidos ou utilizados animais para atividades de ensino ou pesquisa científica. No caso de roedores e lagomorfos, deve possuir controle das condições ambientais, nutricionais e sanitárias;

Instalação de produção - Instalação na qual são produzidos animais para atividades de ensino ou pesquisa científica;

Instalação de manutenção - Instalação na qual são mantidos animais para atividades de ensino ou pesquisa científica;

Instalação de utilização – Instalação na qual são alojados animais incluídos em atividades de ensino ou pesquisa científica por tempo superior a 12 horas;

Laboratório de utilização - Local destinado à realização de procedimentos com animais.

Espécies

Camundongo

O camundongo de laboratório é um mamífero da família Muridae, subfamília Murinae, da ordem Rodentia e gênero *Mus*. O seu nome científico é *Mus musculus*. O qual detém múltiplas linhas, incluindo três principais subespécies, com distribuição geográfica distintas.

Em geral os camundongos são dóceis, de fácil manuseio, ciclo de vida curto, fecundidade alta (potencial de reprodutibilidade), fundo genético das linhagens isogênicas conhecido, curta gestação, tamanho pequeno e relativamente de baixo custo. Essas características tornam os camundongos modelos de eleição para estudo de genética, teratologia e gerontologia. Nos estudos de genética, estima-se uma similaridade dos genomas do camundongo e o homem de 70% a 90% (Ko *et al*, 2008).

Rato

O rato de laboratório, ou rato Norway, é a forma domesticada da espécie *Rattus norvegicus*. Embora o gênero *Rattus* possua cerca de 300 espécies, a outra espécie mais conhecida é *Rattus rattus*, ou rato preto. O gênero pertence à ordem Rodentia e à Família Muridae. Os ratos são curiosos, inteligentes e exibem comportamento com amplo repertório de ação. Eles tendem a ser dóceis, mostrando agressividade somente na defesa de seus filhotes. O seu comportamento comum inclui a posição em pé, usada para explorar o ambiente; enfrentamento, uma forma de recreação entre ratos jovens; e limpeza da pelagem. Os ratos não são neofóbicos, como outros roedores, e interagem prontamente com objetos novos colocados em seu ambiente. Os ratos têm hábito noturno e geralmente têm três períodos de atividade: no início, no meio e ao final da noite. Eles se alimentam durante esses períodos de atividade, fazendo três a cinco refeições. O êxito do rato *Norway* em todo mundo deve-se, em parte, ao fato da espécie ser onívora, e ter uma notável capacidade para balancear os nutrientes ingeridos, dentro da diversidade de condições alimentares (Lapchik *et al*, 2008).

Cobaia

A cobaia (*Cavia porcellus*) é um roedor da família Caviidae, conhecido também como porquinho da Índia. A espécie mais utilizada em pesquisas é a *C. porcellus*. As cobaias são animais sociáveis, tímidos, dóceis e raramente mordem ou arranham. Os adultos, frequentemente, mordem as orelhas dos jovens e os machos podem brigar violentamente, durante disputas por uma fêmea em estro, até que se estabeleça a hierarquia do grupo.

Assustam-se facilmente, defecam e urinam nos comedouros e derramam sua alimentação pelo piso da gaiola. Vocalizam demonstrando prazer antes de situações gratificantes (alimentação) e ficam juntas ou em cima umas das outras durante o manejo da colônia pelo técnico. As cobaias podem ser alojadas para reprodução em pares ou haréns e os jovens estão totalmente desenvolvidos no nascimento. O desmame ocorre em 2-3 semanas, mas geralmente o jovem alimenta-se com sólidos e água dentro de poucos dias após o nascimento. Em alguns países é um animal utilizado também na alimentação humana (Bueno *et al*, 2008).

Hamster

O hamster sírio ou dourado (*Mesocricetus auratus*) é o mais utilizado com fins didáticos e científicos, pertencentes à família Cricetidae (ainda que alguns taxonomistas as coloquem entre os Muridae). Diferentemente de outros roedores usados em laboratórios não há muitas informações sobre a biologia do hamster em vida livre. Apresentam hábitos noturnos, são curiosos e constroem tocas elaboradas com várias entradas. A fêmea, quando adulta, apresenta um porte superior ao do macho diferentemente da maioria dos roedores, em que o macho é maior que as fêmeas. Os machos não demonstram agressividade com as fêmeas apenas com outros machos. Em cativeiro é possível o arranjo de indivíduos do mesmo sexo, entretanto, para que se tenha sucesso nesse tipo de arranjo é necessário que se formem os grupos ao desmame. O hamster sírio é uma espécie sazonal, em vida livre, hibernam durante os períodos de dias curtos com baixa luminosidade, baixas temperaturas (inferiores a 5°C) e disponibilidade escassa de recursos alimentares e de material para construção de ninho (Mori *et al*, 2008).

Coelhos

Coelhos e lebres pertencem a uma ordem distinta, a dos lagomorfos (ordem Lagomorpha), portanto não são roedores. O ancestral do coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) é o coelho selvagem, um mamífero da ordem Lagomorpha com uma grande capacidade de adaptação a diferentes regiões climáticas. A domesticação do coelho é, de fato, recente e não produziu ainda mudanças substanciais no comportamento quando comparado ao coelho selvagem. Apesar da grande variedade entre as raças atuais, as características comportamentais pouco mudaram, mesmo com a domesticação, ou seja, nenhum padrão comportamental foi perdido ou criado. Vários tipos de comportamento mantêm-se: o comportamento de manutenção, comportamento materno e o comportamento social. A duração, frequência e intensidade com que os animais os expressam dependem da raça, das condições ambientais e, conseqüentemente, do nível de estresse a que são submetidos. Os

coelhos são animais sociáveis que, em vida livre, vivem grande parte do tempo em grupo e em contato próximo uns com os outros. As lutas não são frequentes porque a hierarquia é claramente definida quando existe um ambiente que simule uma aproximação ao ambiente natural (Moura & Mattaraia, 2008).

Procedimentos para área de produção e manutenção de roedores e lagomorfos.

As tarefas diárias em uma instalação de ensino ou pesquisa científica destinada a produção e manutenção das cinco espécies tratadas neste capítulo (camundongo, cobaia, coelho, hamster e rato) são bastante complexas, variam de acordo com a estrutura física, com a disponibilidade de equipamentos, com o padrão sanitário e genético dos animais e a finalidade da produção. Uma forma eficiente e segura para que se alcance a realização das tarefas reunindo todos esses interesses com sucesso e de maneira contínua é a implantação dos Procedimentos Operacionais Padrão (POPs), documento que descreve passo a passo as etapas cronológicas sucessivas para a realização do desenvolvimento de uma atividade, garantindo, assim, a padronização de tarefas. Na área de produção ou manutenção de animais deve haver um POP para cada atividade, desde as consideradas mais simples como a limpeza das gaiolas, até o sistema de acasalamento específico para linhagens transgênicas. Quando da elaboração de um POP deve-se envolver a colaboração de todos os funcionários que desempenham a atividade, inclusive responsável técnico, possibilitando assim, que os mesmos possam também, estar preparados para avaliação do nível de bem-estar dos animais, que é de suma importância para diagnóstico e tratamentos/modificações rápidas, evitando-se dessa forma sofrimento dos animais.

Todos os equipamentos devem ser regularmente validados e estar com as suas especificações, instruções de uso e de limpeza fixadas próximo do equipamento, em local de fácil visibilidade.

A estrutura física das instalações de produção ou manutenção de animais é idealizada com o objetivo de atender a especificidade do modelo biológico que produz ou mantém. Entretanto, há áreas básicas que estão presentes em todas as instalações, essas áreas estão detalhadamente explicitadas no Capítulo Estrutura Física e Ambientes para Roedores e Lagomorfos.

Neste Capítulo vamos descrever as atividades executadas no interior das áreas destinadas direta ou indiretamente à produção ou manutenção de camundongos, cobaias, coelhos, hamster e rato.

Recinto primário e secundário

Nas instalações destinadas à produção e manutenção de roedores e lagomorfos utilizados para ensino ou pesquisa científica, há duas grandes áreas comumente tratadas como área de produção de animais ou área limpa e área de higienização, tradicionalmente chamada de área suja. Nome considerado impróprio, uma vez que se refere a uma área restrita que guarda uma inter-relação com o que acontece na área de produção. Essa divisão fundamental entre as áreas ocorre devido às barreiras sanitárias que protegem a área limpa. Primordialmente falamos das autoclaves de barreira (dupla porta) e de sistema de filtração de ar.

Na área de produção temos as salas de animais, as quais são denominadas como macroambiente ou recintos secundários. As salas de animais devem ter ambiente controlado e suas variáveis registradas diariamente. O ambiente mais próximo ao animal é denominado de recinto primário, nesse caso a gaiola, também denominado de microambiente. Recentemente o Conselho Nacional de Controle Experimentação Animal – CONCEA estabeleceu parâmetros de temperatura, umidade, luminosidade, ruído, vibração e espaço mínimo para produção ou manutenção de roedores e lagomorfos, no Capítulo Estrutura Física e Ambientes para Roedores e Lagomorfos.

As espécies tratadas neste capítulo são todas sociáveis, isto é, vivem em grupos. O ambiente destinado a elas deve permitir alojamento em pares ou grupos, sendo desaconselhado o alojamento individual, o qual necessita de justificativa robusta e aprovação da CEUA institucional para que aconteça.

O ambiente primário, a gaiola, deve suprir as necessidades básicas dos animais e permitir que o animal desenvolva seu repertório comportamental pertinente a sua fase de desenvolvimento. A gaiola precisa ser segura para evitar fuga dos animais, mas, também, com material impermeável, atóxico e não apresentar pontos de risco no seu interior, como ângulos, arestas, saliências, ranhuras ou bordas que possam ferir ou machucar os animais, bem como evitar o acúmulo de sujeiras. Um detalhe que requer muita atenção no ambiente primário dos animais é o assoalho das gaiolas que deve permitir a movimentação natural dos animais, evitar derrapagens e lesões nas patas. Assoalhos gradeados devem ser substituídos, principalmente no caso de reprodutores pois, devido ao peso de animais maiores e seu tempo de permanência nas gaiolas, este tipo de piso quase sempre causa lesões nos membros posteriores de coelhos. O ambiente primário deve estimular positivamente o animal, com desafios que previnam a ansiedade, frustração e o estresse crônico, mantendo bons níveis de

bem-estar e, conseqüentemente, não comprometer os índices de seu desempenho (vide ítem sobre enriquecimento ambiental)

São diversas as atividades realizadas em uma instalação de produção ou manutenção das espécies de animais de laboratório tratadas neste capítulo, elas podem ocorrer diariamente, semanalmente e mensalmente, dependendo da especificidade de cada atividade. A frequência com que são realizadas mantém uma relação de dependência com características de espaço, infraestrutura e administração de cada instituição, bem como do protocolo de pesquisa.

Procedimentos para área de produção e manutenção de roedores e lagomorfos.

- **Alimentação e Hidratação**

- **Alimento**

O estado nutricional do animal pode influenciar o seu crescimento, reprodução, longevidade, seu nível de bem-estar, dentre outros processos fisiológicos. Todas as cinco espécies (camundongo, cobaia, coelho, hamster e rato) devem receber uma dieta palatável, que forneça as necessidades nutricionais e comportamentais adequadas à espécie, exceto quando o estudo exija outro tipo de conduta e o projeto tenha sido avaliado e aprovado pela CEUA. Os requerimentos nutricionais para roedores e lagomorfos citados nestes capítulo, estão definidos nas publicações do *National Research Council Committee on Animal Nutrition*.

O alimento mais usual no Brasil, para os roedores e lagomorfos mantidos em ambientes com finalidade de ensino ou pesquisa científica, são as rações comerciais produzidas a partir de alimentos naturais, ou seja, dieta de fórmula aberta, elaborada a partir de produtos agrícolas e derivados. Neste tipo de ração pode haver uma variação na composição dos nutrientes devido à variabilidade das plantas, época de colheita, condições do tempo, procedimento de colheita, procedimentos de estocagem, métodos de fabricação e moagem, que influenciam a composição de nutrientes dos ingredientes usados nesses tipos de dieta e conseqüentemente levando à produção de dois lotes da mesma dieta não idênticos. Essa variação nas concentrações dos nutrientes da dieta pode tornar-se uma variável não controlada capaz de afetar resultados. Outra questão refere-se ao grau de contaminação dos ingredientes naturais que ocorre naturalmente pela sua exposição a vários contaminantes ou causados pelo homem. A presença de resíduos de pesticida em baixas concentrações, que não cause problemas na saúde do animal, pode afetar os resultados da pesquisa. Por exemplo, uma concentração de chumbo de 0,5-1,0 ppm é inerente em dietas de ingredientes naturais de roedores e geralmente não é prejudicial à saúde animal, mas poderia influenciar

ANEXO I

substancialmente os resultados de estudos toxicológicos projetados para avaliarem compostos a serem testados que contenham chumbo.

Dietas certificadas são àquelas que foram previamente testadas para constatação de contaminantes e produzidas de acordo com as exigências de Boas Práticas de Laboratório (BPL).

Dietas purificadas são formuladas com ingredientes que foram refinados de maneira que cada ingrediente contém um único nutriente ou classe de nutriente. As concentrações de nutrientes nesse tipo de dieta são menos variáveis e mais controladas que nas dietas de ingredientes naturais.

Dietas quimicamente definidas são formuladas com os elementos quimicamente puros extraídos de ingredientes disponíveis, tais como aminoácidos, açúcar específico, triglicérides quimicamente definidas, ácidos graxos essenciais, sais inorgânicos e vitaminas puras. Uso desse tipo de alimentação fornece o grau mais alto de controle das concentrações de nutrientes da dieta. Entretanto, nem sempre são prontamente consumidas pelos roedores de laboratório, e apresentam elevado custo para uso geral. As concentrações de nutrientes em dietas quimicamente definidas são teoricamente fixadas na hora da fabricação; entretanto, a biodisponibilidade dos nutrientes pode ser alterada pela oxidação ou interação de nutrientes durante estocagem da dieta.

Os roedores e lagomorfos apresentam crescimento contínuo dos incisivos sendo, portanto, necessário o oferecimento de alimentos com grau de dureza que estimule e provoque o desgaste dos dentes. Entretanto, quando se trabalhar com animais mutantes ou modificados (AnGM), deve-se considerar a composição e o tipo de apresentação dos alimentos adequado ao comprometimento do animal. Há mutantes que apresenta ausência ou malformação dentária, nestes casos um alimento pulverizado ou gelatina nutritiva permitirá corrigir este inconveniente. Mutantes portadores de distúrbios neurológicos ou musculares graves podem morrer devido à sua incapacidade de obter o alimento do comedouro ou a água da mamadeira. Recomenda-se deixá-los a sós com uma mãe nutriz e de pôr à disposição dos mesmos uma gelatina nutritiva ou um alimento pastoso com alto teor energético durante as primeiras semanas de vida.

Em condições normais, alimentos não devem ser dispostos sobre a forração da gaiola onde pode ser contaminados ou desperdiçados. Exceções são feitas à oferta de alimentos para animais que, por qualquer motivo, não consigam acessar o local destinado para a ração na gaiola de manutenção.

Os animais apresentam particularidades nas suas exigências nutricionais, as cobaias, por exemplo, são incapazes de sintetizar a vitamina C (ácido ascórbico) em quantidade

suficiente para satisfazer as suas necessidades diárias. Insuficiente ingestão de vitamina C pode levar à debilidade, aumento da susceptibilidade às doenças e, eventualmente, para o escorbuto. Portanto, para essa espécie a vitamina C deve ser disponibilizada na ração, na forma de forragem ou suplementada na água de beber.

A dominância entre roedores é bem relatada, portanto, quando animais são mantidos em grupos, deve-se tomar cuidado para garantir que os subordinados tenham acesso suficiente à comida e água. É importante ter mais de um ponto de acesso para o alimento e água, com distribuição dos comedouros e bebedouros nas gaiolas, a fim de permitir o acesso de todos do grupo e reduzir a possibilidade de competições e agressões. Quaisquer alterações significativas na ingestão de alimentos devem ser investigadas. O escore corporal dos animais é um bom indicador, fácil para coletar e para interpretar, devendo fazer parte dos POPs para avaliação do bem-estar dos animais. Animais com baixo escore corporal sinalizam algo de anormal e que deva ser investigado e rapidamente corrigido, podendo se relacionar com a alimentação, doenças, estresse, etc.

Os comedouros devem permitir acesso fácil ao alimento, minimizar sua contaminação com a urina e fezes, garantindo a qualidade nutricional e sua boa condição.

Recomenda-se irradiar ou autoclavar alimentos utilizados em áreas controladas do ponto de vista sanitário. A autoclavação diminui a concentração de algumas vitaminas e antioxidantes, portanto, as dietas autoclaváveis devem conter maiores concentrações de ingredientes susceptíveis ao calor para compensar as perdas induzidas pela esterilização em autoclaves.

Outros itens de alimento, além da ração, podem ser oferecidos aos animais como grãos, vegetais e forragens. Entretanto, só devem ser oferecidos após rigorosa higienização e avaliação da CEUA, pois podem representar a entrada de algum tipo de infecção, bem como interferir em algum procedimento utilizado na atividades de ensino ou pesquisa científica.

- **Estocagem dos alimentos**

A ração deve ser armazenada em recintos, cobertos, ambientes limpos, secos, arejados, sem odores e protegidos do sol e do calor, de modo a minimizar a deterioração e contaminação. O tempo de armazenamento proposto pelo fabricante garantirá a qualidade dos nutrientes se a área de estocagem for mantida a temperaturas entre 18 a 20°C.

Dietas para animais devem ser utilizadas dentro do prazo de validade estabelecido pelo fabricante e armazenadas em instalações com as características já descritas. Dietas irradiadas, desde que mantidas nestas mesmas condições, apresentam um prazo de validade maior, mas, sempre deve ser seguida a orientação do fabricante.

ANEXO I

Os sacos de ração devem ser mantidos sobre estrados de preferencia de plástico, afastados da parede e armazenados de maneira a facilitar a utilização dos mais antigos primeiro. O local destinado para armazenar a ração não deve alojar outros insumos. Condição precária de armazenamento pode resultar em contaminação ou mesmo perda de nutrientes, que pode não ser facilmente detectada.

Outros cuidados devem ser tomados em relação à aquisição do alimento para os animais. Os responsáveis pela compra de ração devem ter conhecimento que não é benéfico submeter os animais a variações bruscas de alimento. Na hora de selecionar um fornecedor de ração devem ser considerados os procedimentos de fabricação do produto, seu transporte, bem como controle de qualidade que garanta o padrão final do alimento a ser adquirido.

- **Água**

Água potável, fresca e limpa deve ser oferecida à vontade, exceto quando a proposta em estudo não permita. O monitoramento da qualidade da água é um importante aspecto do programa de pesquisa, uma vez que a contaminação e composição química da água podem afetar os resultados dos estudos com animais.

Métodos disponíveis para remover tanto agentes microbianos quanto contaminação química da água inclui: autoclavação, acidificação, cloração, osmose reversa, ultrafiltração e luz ultravioleta. Contudo, alguns destes métodos podem alterar a função imunológica e a taxa de crescimento do modelo biológico utilizado.

O padrão mínimo para água dos animais deve ser água potável, ou seja, água que não ofereça riscos à saúde e que atenda ao padrão de potabilidade (Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011/MS) deve estar disponível com livre acesso para todos os animais, exceto quando o proposta do estudo exija condição diferenciada. Entretanto, deve ter sido avaliado e aprovado pela CEUA da instituição.

Deve haver um programa pré-estabelecido e registrado de fornecimento de água fresca aos animais, como também, de higienização dos bebedouros e bicos de acordo com os POPs institucionais.

Os bebedouros devem permitir a observação da limpeza e nível da água; suportar a esterilização e ter um formato de boca larga para permitir uma boa higienização. Os bebedouros devem ser sempre substituídos por limpos e com água fresca, e não completados. O fornecimento de água aos animais, quase sempre acompanha a mesma frequência de troca das gaiolas. Não se recomenda completar a água das mamadeiras, pois esta prática exige um controle muito rígido para que não se cometa contaminação cruzada.

Bebedouros automáticos são equipamentos econômicos, mas se não forem adequadamente projetados são difíceis de serem desinfetados e podem promover contaminação cruzada.

Modificação da ingestão de alimento e água

Conforme já relatado, os animais devem ter fácil e acesso irrestrito a uma dieta nutricionalmente balanceada e água de qualidade. Em alguns protocolos de pesquisa, o valor nutricional da ração é modificado qualitativa ou quantitativamente; ou o período de acesso ao alimento ou à água é alterado.

Compete a CEUA institucional avaliar cada um destes protocolos e mediante consistente justificativa científica considerar pertinente, ou não, uma vez que estas condutas podem causar efeitos adversos à saúde e ao bem-estar dos animais.

- **Restrição alimentar**

Animais se alimentam em busca de suas necessidades de energia e nutrientes, e podem gastar boa parte do seu tempo comendo, caso não haja outros estímulos (enriquecedores ambientais) no seu ambiente. Porém, quando não há restrição de acesso, algumas espécies ou indivíduos podem comer além de suas necessidades fisiológicas. O acesso irrestrito ao alimento permite um desenvolvimento corporal normal, mas pode diminuir a longevidade, aumentar a incidência de doenças degenerativas e neoplasia e por vezes, aumentar o risco de obesidade.

O controle da disponibilidade de alimento para o animal pode ser simulada tendo em conta a disponibilidade variável de alimento que ocorre na natureza. Como mencionado anteriormente, a redução da ingesta pode aumentar o tempo de vida e reduzir a incidência de obesidade e algumas doenças nos animais. Por outro lado, a restrição calórica pode também estressar e reduzir a taxa de crescimento em animais jovens e perda de peso corporal nos adultos. Estes problemas poderão ser mais acentuados se o alimento for de baixa qualidade nutricional ou desbalanceado. A restrição alimentar em conjunto com outros fatores estressantes pode estar associada às ulcerações gástricas em ratos e à morte em camundongos, sendo, portanto, motivo de sofrimento e baixos níveis de bem-estar. É importante lembrar que, ao calcular a quantidade de alimento que será disponibilizada durante a restrição alimentar, deve-se considerar que em torno de 40% da quantidade de consumo diário, hídrico e alimentar, dos roedores é desperdiçada e não ingerida por eles.

Períodos de privação total de alimentos (jejum) podem prejudicar a saúde e o bem-estar dos animais. A duração do jejum precisa ser justificada em um contexto científico específico da espécie, condição fisiológica e de saúde dos animais envolvidos, o que não se

justificaria para o uso no ensino. Para o uso científico, portanto, qualquer período de privação de alimento proposto para o animal deve ser avaliado cuidadosamente quando submetido à apreciação da CEUA.

- **Restrição de líquidos**

A ingestão de líquidos é influenciada pela sede, tipo de dieta, disponibilidade de líquido entre outros. A restrição de líquidos pode aumentar o risco de desidratação e ingestão reduzida de alimentos. Uma redução aguda de ingestão hídrica pode resultar em rápida perda de mais de 15% de peso corpóreo, sede, secura das membranas da mucosa, produção reduzida de urina, redução de consumo alimentar, perda da elasticidade da pele, letargia, choque e colapso cardiovascular. A desidratação é uma complicação comum que pode não ser reconhecida facilmente em seu estágio inicial sem um monitoramento cuidadoso e funcionários capacitados.

Alguns estudos restringem a ingestão de líquidos antes da anestesia ou transporte. Da mesma forma mencionada para privação de alimento, a privação hídrica precisa ser determinada dentro de um contexto científico específico de acordo com a espécie, o estado fisiológico e de saúde do animal envolvido, o que não se justificaria para o uso do procedimento no ensino. Para o uso científico, o procedimento deve ser avaliado cuidadosamente pela CEUA.

Estratégias de controle de dor e distresse devem ser utilizadas quando a disponibilidade de ração ou a água forem alteradas em animais. Estas estratégias incluem o controle da desidratação, diminuição de crescimento e perda de peso. Se estas observações não fizerem parte da proposta do estudo, medidas de controle e prevenção devem ser adotadas.

- **Modificação de comportamento alimentar ou hídrico**

Alimento ou líquido pode ser usado como recompensa, mesmo para animais bem alimentados. Muitas vezes, entretanto, os animais precisam estar com fome ou sede para trabalhar ou realizar uma tarefa para receber alimento ou água como recompensa. Em todos os casos onde o pesquisador possa causar impacto sobre a ingestão de água e alimento, uma justificativa científica, circunstanciada, deve ser fornecida à CEUA, para submeter o protocolo à aprovação. O procedimento não se aplicaria ao uso no ensino, apenas ao uso científico.

Manejo

O manejo dos animais em instalações destinadas à produção de roedores e lagomorfos deve ser descrito em procedimentos claros e acessíveis a todos os funcionários que lidam com

ANEXO I

a produção. São várias as atividades ligadas diretamente à produção e manejo, apesar de serem comuns a todas as espécies (camundongo, cobaia, coelho, hamster e rato) são realizadas em intervalos diferenciados obedecendo ao ciclo biológico e comportamento específico de cada espécie. Fundamentalmente em uma produção temos as principais atividades: acasalamento, desmame, sexagem, reposição de reprodutores e a troca. É imprescindível que todas as atividades de produção estejam estabelecidas em POPs, descritas de forma clara e com suas frequências definidas. Também é desejável o registro das atividades.

Conhecer profundamente as espécies que se está manejando é fundamental para um bom manejo e manutenção de bons níveis de bem-estar animal. Os funcionários devem conhecer o comportamento e biologia dos animais para minimizar as situações de estresse e promover situações que gerem estímulos prazerosos. O manejo etológico é o que leva em consideração o comportamento dos animais, sua biologia e o controle de elementos estressores para desempenhar as atividades ou manejo necessário com os animais, e deve ser aplicado em todas as formas de manipulação e manejo.

O quadro a seguir apresenta a idade mais usual para acasalamento e desmame de camundongo, cobaia, coelho, hamster e rato.

Idade ou Peso					
Atividade	Camundongo*	Cobaia**	Coelho***	Hamster****	Rato*****
Acasalamento	55 a 60 dias	45 a 55 dias	150 a 180 dias	50 a 60 dias	90 dias
	25 a 30g	400 a 480g	3.5 a 4 kg	85 a 150g	250 a 400g
Desmame	21 dias	14 dias	30 a 45 dias	21 dias	21 dias
	10 a 12g	180 a 200g	800 a 1000g	35 a 40g	45 a 50g

*Camundongo Swiss; **Cobaia Inglesa; *** Coelho New Zealand White; **** Hamster Sírio; *****Rato Wistar, todos heterogênicos.

O padrão genético do animal pode alterar os parâmetros apresentados para peso e idade de acasalamento e desmame. Animais isogênicos (*inbred*), mutantes ou modificados, podem necessitar de condições diferenciadas de manejo. No manejo mais usual de isogênicos, já ao desmame, formam-se os casais entre irmão, com o objetivo de facilitar o manejo e minimizar espaço e quantidade de gaiolas. Entretanto, há instituições que definem o manejo de desmame de isogênicos da mesma forma dos heterogênicos (*outbred*) e posteriormente

juntando-os para o acasalamento. Esta prática exige mais cuidados com os dados das fichas para evitar possíveis perdas de dados.

Animais que apresentem distúrbios que acarretem limitações de aleitamento devem contar com a ajuda de outra nutriz, como ferramenta de manejo, que garanta a sobrevivência da ninhada.

No desmame também ocorrem algumas particularidades dependendo da espécie, ou mesmo da característica da linhagem.

Adotou-se dizer que o desmame ocorre aos 21 dias de idade, para ratos e camundongos em sistemas intensivos. Esta afirmação se torna obrigatória quando a fêmea que aleita vai parir uma nova ninhada e a ninhada anterior permanece na gaiola. Não deve ser aceito duas ninhadas da mesma fêmea na mesma gaiola. Isso não se aplica para todas as espécies. No caso de cobaias, o desmame ocorre quase sempre pelo parâmetro do peso, pois como esses animais nascem completos, 21 dias de idade, torna-se um período muito longo.

No momento do desmame os animais heterogênicos ou animais isogênicos que serão destinados diretamente aos usuários devem ser separados por sexo (sexagem), alojados em gaiolas distintas (machos e fêmeas) identificadas e acomodadas nas salas ou estantes de estoque de animais, onde são mantidos aguardando sua utilização. Existem algumas particularidades, como quando os animais são destinados aos usuários antes do desmame, como nos casos de fornecimento de recém-nascidos para alimentação de outros animais. Cuidado especial deve ser dado ao fornecimento de animal que não consegue se alimentar sozinho, ou seja, na condição de lactente. Quando do fornecimento de animais lactentes desacompanhados de suas mães, o usuário deve estar preparado para receber os lactentes e imediatamente proceder a utilização dos mesmos.

Acasalamento é uma atividade frequentemente realizada nas instalações destinadas a produção de animais, sua realização requer um conhecimento prévio do padrão genético do animal a ser acasalado, da necessidade de reposição de reprodutores e da demanda de animais fornecido aos usuários.

O acasalamento de colônias de animais *outbred* deve seguir esquemas que evitem o cruzamento de indivíduos aparentados, como o esquema rotacional de Poiley ou Han rotacional. Essas colônias devem ser grandes o suficiente para assegurar por muitos anos a heterozigose genética dos animais.

ANEXO I

O acasalamento de animais isogênicos acontece entre irmãos. Quando suas progênes F1 forem usadas, é importante monitorar periodicamente a autenticidade genética.

Acasalamentos de animais geneticamente modificados (AnGM), requerem condições especiais de manejo de suas populações. Estratégias de reprodução cuidadosamente desenhada e assessoramento genotípico devem ocorrer sempre, com o objetivo de minimizar a possibilidade de animais com genótipos indesejáveis. O trabalho com AnGM, requer autorização da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

Os acasalamentos podem ser monogâmico, 1 macho para 1 fêmea (1:1), poligâmico 1 macho para duas fêmeas(1:2), ou mais, sempre respeitando-se as recomendações de espaço. No caso de produção de cobaias é muito usual o sistema de harém 1 macho para até 5 fêmeas, o que não é considerado errado, desde que o espaço dedicado a esse arranjo esteja dentro do estabelecido no Capítulo Estrutura Física e Ambientes para Roedores e Lagomorfos.

Para cobaia, utiliza-se: o método *Poiley*, sistema poligâmico, harém intensivo (1 macho para 5 fêmeas), respeitando-se o espaço recomendado para a espécie.

Para coelhos aplica-se o método *Poiley*, sistema poligâmico temporário. Nessa espécie o pareamento dos animais só ocorre para a cópula, quando a fêmea deve ser levada à gaiola do macho e após a cópula, removida para a sua gaiola. A proporção de machos para fêmeas deve ser mantida em torno de 1 macho para 5 fêmeas, porém, os animais são mantidos separados.

Hamsters são acasalados quase sempre em sistemas monogâmicos intensivos. Devido ao comportamento mais agressivo destas fêmeas, a poligamia não apresenta bons resultados.

- **Identificação**

Os registros dos animais devem constar nas etiquetas, (cartões, fichas) fixados na gaiola, entretanto, outro tipo de registro como livros ou planilhas computadorizadas, sempre atualizadas, que resumam a disponibilidade de animais na instalação de produção é requerido. O segundo registro é importante devido à constante manipulação das gaiolas e fragilidade das etiquetas, que pode acarretar na perda das informações. Nas fichas das gaiolas dos reprodutores devem constar dados como: espécie, linhagem, data de nascimento, dados dos pais, sexo, data do acasalamento, data dos partos, números de nascidos, números de mortos, data de desmame e quantidade de filhotes desmamados. Animais em salas de estoque também necessitam de fichas com os dados de data de desmame, sala de origem, sexo e quantidade de animais por gaiola. Quando do recebimento dos animais pelos usuários, mais

ANEXO I

dados podem ser acrescentados a ficha dos animais, como: data de recebimento, nome do pesquisador responsável pelo animal, número do protocolo que requisitou, entre outros.

Além das fichas nas gaiolas pode-se ter vários outros tipos de informações individual dos animais, que são importantes para a gestão da instalação de produção, tais como: identificação do genótipo, para acompanhar cruzamentos, dados sobre a saúde animal, registros médicos e dados de pesquisa. Existem vários métodos disponíveis para a identificação de roedores, incluindo furos na orelha, brincos, tatuagens, marcação com tinta, microchips subcutâneos. Todos os métodos têm vantagens e desvantagens, a escolha do método depende do nível de exigência do proposta de estudo, da viabilidade financeira e do animal a ser identificado e da aprovação da CEUA institucional. Entretanto, métodos como furo na orelha e tatuagem devem ser realizados em animais com até três semanas de idade, sem anestesia e posterior a isto, apenas com o animal anestesiado. Quando o procedimento de genotipagem estiver estabelecido, o tecido resultante da perfuração da orelha deve ser usado para esse fim. Para marcação com tinta deve ser usado tinta atóxica e sem cheiro.

- **Troca**

Assim denomina-se a atividade de transferência dos animais de uma gaiola onde estavam (gaiola suja) para nova gaiola (gaiola limpa). Esta tarefa não deve ser um ato mecânico e sim um momento para aplicação do manejo etológico e de observação do animal, uma vez que é na troca que se percebe alterações no estado de saúde do animal (Olsson *et al.*,2003) A frequência da troca é uma consequência da estrutura física da instalação onde estão mantidos os animais, do material oferecido para cama, número de animais na gaiola e estado fisiológico desses animais. Em sistemas de gaiolas abertas com uma boa renovação de ar (10 a 20 trocas de ar por hora) em sistemas poligâmicos pode ser realizado duas trocas por semana; nos (microisoladores) com animais em acasalamentos monogâmicos e bom material de cama, a frequência pode chegar de 10 a 14 dias sem troca. Tudo depende da capacidade do sistema de trocas de ar de cada equipamento, mas o objetivo é um só, diminuir o teor de amônia dentro das gaiolas dos animais e a manutenção do bem-estar. Animais diabéticos ou com outras alterações fisiológicas específicas, podem requerer frequência de trocas especiais.

Chamamos de cama ou forração o material usado para forrar o interior das gaiolas, este insumo é de extrema importância, devido sua proximidade com os animais. No Brasil, o produto mais usado para forração é a maravalha (produto resultantes da raspa de madeira), mas recentemente tem chegado a xilana, um subproduto do sabugo de milho, que reduz o acúmulo de amônia no interior das gaiolas. Como regra geral a forração deve ser macia,

absorvente, atóxica e inodora. Recomenda-se a esterilização da forração, seja por autoclavagem ou irradiação.

O critério para estabelecer a quantidade de forração colocada em cada gaiola deve ser que essa seja suficiente para absorver os excrementos eliminados pelos animais no período entre as trocas, com o cuidado de não interferir na movimentação dos animais na gaiola, mas permitir que desenvolvam tipos específicos de comportamento como esconder-se e confeccionar ninho.

O fornecimento de verde (capim, feno, hortaliça, etc.) é bem visto, como item de enriquecimento alimentar ou como fonte de alimento, sendo mais usual em áreas de produção de coelhos e cobaias. Esse tipo de fornecimento requer um difícil processo de desinfecção que deve ser descrito em POP.

Programas de enriquecimento ambiental devem ser bem elaborados, considerando a biologia do animal, o espaço físico disponível na gaiola e permitir uma higienização, seja química ou por autoclavagem. Seu fornecimento pode acompanhar a troca das gaiolas

Área de higienização

Na área de higienização, também chamada área de lavagem, “pulsa o coração da instalação de produção”, pela característica de seus procedimentos, é a área mais sujeita a pressões, e se tudo ocorre nas condições previstas, grande parte dos problemas está resolvido.

As gaiolas e os bebedouros trocados na área de produção são enviados para essa área, onde devem seguir uma sequência de processos até o seu retorno à área dos animais. Portanto, é imprescindível que esse espaço esteja separado, isolado e o mais distante possível das salas de animais.

Um programa de higienização deve ser estabelecido com o objetivo de reduzir ou eliminar as formas vegetativas de bactérias patogênicas e oportunistas, bem como outros organismos que possam ser controlados antes da esterilização. A lavagem é mais efetiva quando realizada com água aquecida por volta de 82,2°C, acompanhado de produtos químicos, que atendam essa finalidade. Na lavagem manual deve ser atribuída atenção especial às etapas de molho e enxague, etapas que pode interferir diretamente no bem-estar animal, quando após a lavagem ainda ocorrem resíduos do produto químico utilizado. Portanto, a diluição e o tempo de ação do produto devem seguir a orientação do fabricante. O ideal é a lavagem em máquinas que têm auto dosador, ou seja, regula a quantidade de sanitizante de acordo com a quantidade de água utilizada. Após o processo de lavagem e desinfecção, os

recintos primários (gaiolas) devem ser esterilizados de preferência em autoclaves e esses devem ser validados para garantir segurança.

Após a lavagem dos utensílios, eles devem ficar sobre estrados plásticos para que escorram o excesso de água e, posteriormente, devem ser levados às autoclaves para serem esterilizados. Para remoção de alguma sujeira depositada nos bicos, usa-se o ultrassom. Tanto os bicos quanto as rolhas devem ser lavados e esterilizados por autolavagem, antes de retornarem aos animais.

Independentemente do processo de higienização ser automático ou manual, é imprescindível que sua eficácia seja testada. Quando automatizado, deve ocorrer a validação do equipamento de acordo com instruções do fabricante ou da Garantia da Qualidade envolvida no processo. Quando manual, deve ser realizado monitoramento por meio de cultura microbiológica ou ainda por meio de sistemas de detecção de material orgânico.

Limpeza e desinfecção do ambiente secundário (salas e espaços de apoio) devem seguir um planejamento de limpeza para todas as áreas da instalação, ou seja, um procedimento onde se descreve como será realizada a limpeza, seu fluxo, frequência, tipos de produtos que serão usados entre outros detalhes inerentes a particularidade da atividade exercida.

A frequência de limpeza, como já mencionado no item troca, também será uma consequência da estrutura física, sistema de ar, material oferecido para cama, número de animais na gaiola e estado fisiológico desses animais, imposições do projeto científico.

Todas estas atividades devem constar nos Manuais de procedimento, POPs descrevendo o passo a passo e serem registradas em seus respectivos protocolos, concluindo, desta forma, o ciclo de atividades necessárias à produção de animais de laboratório e permitindo a rastreabilidade de todo processo.

Segurança do Operador

Os operadores que realizam as múltiplas atividades descritas neste capítulo devem usar Equipamento de Proteção Individual (EPI) adequado ao desempenho da atividade. Bem como quando necessário o ambiente deve contemplar Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC). O coordenador da unidade, após análise de risco das atividades, deve requerer ao diretor institucional os EPIs e EPCs adequados a cada atividade. Esses equipamentos de proteção devem constar no respectivo POP de cada atividade ou no manual de procedimento.

Descarte de Materiais

Os resíduos são classificados em função dos riscos potenciais ao meio ambiente e à saúde, como também da sua natureza e origem (ABNT NBR 10.004/2004). Os resíduos ainda são classificados em função de suas características específicas, cujo manejo demanda cuidados e métodos especiais de coleta, transporte e destinação final. Nesse grupo, estão compreendidos os Resíduos de Serviço e Saúde (RSS), os quais são resultantes de atividades exercidas nas atividades relacionadas com o atendimento à saúde humana ou animal, assim como estabelecimentos de ensino e pesquisa na área de saúde, entre outros (RDC 306 ANVISA, 2004). Portanto, faz-se necessário consulta prévia a entidades especializadas para que seja estabelecido um programa de descarte de resíduos adequado à classe e ao grupo a qual a atividade geradora se enquadra.

Cuidados de Fins de Semana e feriados

Deve haver uma programação definida para cuidados dos animais nos fins de semana e feriados, com escala dos funcionários, uma vez que os animais devem receber o tratamento devido diariamente. Planos de contingência e de emergência compatível com o nível de atividade da unidade são imprescindíveis. Deve ser previsto situações como falta de energia elétrica, falta de água fundamentalmente para bebedouros automáticos e situações não previstas como atentados e invasões. Telefones de contatos dos médicos veterinários, dos responsáveis pela unidade devem constar nas instalações como também no departamento de segurança da instituição.

Procedimentos de coleta de fluidos corporais, secreções e excreções.

Neste tópico apresentamos as principais atividades realizadas nos projetos de pesquisas as quais devem acontecer em ambiente diferente das áreas de produção de animais, como consta no Capítulo Estrutura Física e Ambientes para Roedores e Lagomorfos.

Amostras biológicas (fluidos corporais, secreções e excreções) são coletadas do animal para análise de alterações bioquímicas, metabólicas, toxicológicas, imunológicas e fisiológicas. A coleta de sangue é uma ferramenta científica valiosa que permite o monitoramento, de uma forma dinâmica, de diversos eventos biológicos. Seja qual for a amostra a ser coletada, deve-se levar em conta o manejo etológico para o uso da imobilização adequada, para diminuir o tempo de contenção, de coleta e de estresse. O ideal é que a amostra seja colhida de forma asséptica e todo cuidado deve ser tomado para evitar a contaminação cruzada de amostras.

Urina

A análise da urina permite o monitoramento da presença, ausência e concentração de drogas e outras substâncias excretadas. Essa análise pode ser quantitativa ou qualitativa. A análise

ANEXO I

quantitativa de urina permite o monitoramento de pH urinário, proteína, glicose, bilirrubina, hemoglobina, cetona, urobilinogênio, creatinina e a concentração de drogas excretadas, metabólitos e outras substâncias. A análise qualitativa de urina é geralmente usada para monitorar função renal, doença renal, avaliação de anormalidades nutricionais e/ou endócrinas e a excreção de drogas e/ou metabólitos.

A urina pode ser coletada de diversas formas: micção do animal consciente; via catéter urinário, mediante anestesia geral, cistocentese, com o uso de gaiola metabólica, entre outras.

Secreção nasal

Secreções nasais e amostras da conjuntiva são geralmente coletadas para análise de agentes bacterianos ou outros agentes infecciosos. As amostras devem ser colhidas com um *swab* estéril umedecido, mantidas sob refrigeração e analisadas prontamente. Dependendo da espécie, anestesia leve pode ser necessária ao colher secreções nasais para minimizar o desconforto do animal e para obter amostra não contaminada.

Secreção ocular

Amostras conjuntivais devem ser colhidas com um algodão estéril, gaze ou cotonete de dracôn, umedecido. O cotonete deve ser sempre manuseado de forma estéril, mantido em meio de cultura, refrigerado e enviado para o laboratório sem demora.

Material bucal

Amostras de saliva podem ser utilizadas em estudos do sistema imune secretor e do sistema digestivo, para medir cortisol de forma relativamente não invasiva e para detectar sinais de doença infecciosa. Raspagens da mucosa oral são utilizadas como uma fonte de DNA e em estudos virológicos. Dependendo da espécie, a coleta de saliva mista da cavidade oral pode ser simples e não invasiva. Anestesia leve pode ser necessária em alguns casos, por exemplo quando o animal não consiga ser contido adequadamente.

Leite

Amostras de leite são colhidas após a limpeza e secagem da(s) teta(s), evitando-se o uso de antissépticos. As primeiras gotas de leite devem ser descartadas antes que a amostra seja coletada.

Fezes

Exames de fezes podem ser qualitativos ou quantitativos. Pequenos volumes são necessários para estudos qualitativos e são coletados do piso da gaiola ou diretamente do reto no animal imobilizado. Estudos quantitativos requerem que todas as fezes sejam coletadas ao longo de um período de tempo determinado (normalmente 24 horas). Uma gaiola metabólica é o método usual.

Secreção do trato genital

ANEXO I

Amostras de secreções vaginais devem ser retiradas com uma gaze de algodão, um cotonete de algodão ou lavado vaginal, de modo estéril, e aplicado suavemente na região vaginal, para minimizar desconforto ao animal. Amostras para identificação da fase do ciclo estral são examinadas sob o microscópio imediatamente. Atenção especial deve ser dada ao tamanho da fêmea, o cotonete utilizado para coleta deve ter uma relação proporcional a dimensão do canal vaginal da fêmea que será usada.

Sêmen

Os métodos de coleta de sêmen incluem monta natural e coleta na fêmea, eletroejaculação sob anestesia e coleta após eutanásia. Os métodos são espécie-específicos e causam estresse em muitas espécies.

Biópsia da cauda

Procedimento convencional para a genotipagem de camundongos implica no corte da porção distal da cauda para a extração de DNA. A quantidade máxima a ser retirada não deve ultrapassar 0,5cm, devendo sempre ser tentada a coleta de quantidades inferiores a essa. Recomenda-se que a biópsia da cauda seja realizada em camundongos de até 21 dias de idade com uso de analgésicos locais e que anestésicos gerais sejam usados em camundongos com idade superior a essa e em ratos com peso acima de 50 gramas. O procedimento de biópsia de cauda só deve ser realizado por profissionais treinados. Justificativa deve ser apresentada a CEUA para análise e aprovação antes de fazer biópsias de pontas da cauda. Observa-se que a genotipagem pode ser feita com poucas gotas de sangue ou com tecido da orelha, recolhido quando da marcação dos animais.

Sangue

Sangue é coletado de um animal para análise e monitoramento de padrões bioquímicos, metabólicos, toxicológicos, imunológicos e fisiológicos. Orientações para a coleta segura de sangue devem considerar o fato de que todas as espécies têm a mesma relação entre volume de sanguíneo e peso corporal. Animais jovens, idosos, estressados, portadores de doença cardíaca ou respiratória ou mesmo submetidos a manipulações exigem cuidadoso monitoramento, pois são mais sensíveis à perda de sangue. A técnica de contenção do animal e o procedimento de coleta podem alterar alguns padrões bioquímicos do sangue devido ao estresse. É importante habituar o animal ao executor do procedimento e ao procedimento antes de sua realização. Isto pode reduzir o estresse envolvido e gerar resultados mais precisos. O treinamento do executor é fundamental para o sucesso do procedimento e faz parte do refinamento proposto pelo Princípio dos 3R's.

O volume de sangue circulante pode geralmente ser estimado em média como 55-70 ml/Kg do peso corpóreo em animais saudáveis ou 6-8% do peso corpóreo. Animais velhos e obesos podem ter uma redução de 15% no volume de sangue circulante.

O volume máximo recomendado para coleta de sangue é de 10% do volume de sangue circulante em animais saudáveis e bem nutridos, observando um período mínimo de recuperação de 3-4 semanas. A remoção de volumes maiores de sangue é perigosa para a saúde do animal. A remoção de 15% a 20% do volume do sangue induz redução do débito

cardíaco e da pressão sanguínea. A remoção de 30-40% pode induzir choque hipovolêmico e morte. Para coletas repetidas, o volume máximo de 1% do sangue circulante do animal pode ser removido a cada 24 horas.

- **Considerações gerais para minimizar os efeitos adversos da coleta de fluidos corporais, secreções e excreções para orientar a seleção dos métodos:**

Quando amostras forem retiradas de um animal consciente e o procedimento de amostragem for repetido regularmente durante uma pesquisa, o animal deve primeiramente ser aclimatado ao instrumento de imobilização (ex.: por meio de execuções simuladas).

Uma equipe treinada adequadamente utilizando métodos que gerem o mínimo de dor deve realizar a coleta de amostras biológicas.

Quanto mais rápido o procedimento for realizado no animal consciente, melhores as amostras, porque as alterações fisiológicas induzidas por estresse são minimizadas.

A utilização de sistema de recompensa ao coletar amostras de um animal consciente deve ser considerado. Quando o procedimento de amostragem for repetido regularmente durante uma pesquisa, o sistema de recompensa pode favorecer uma associação positiva.

O treinamento do executor é fundamental para o sucesso de todos os procedimentos e faz parte do refinamento proposto pelo Princípio dos 3R's.

Importante a aplicação do manejo etológico para todos os procedimentos de manuseio dos animais.

É importante manter a assepsia ao longo da coleta e os produtos utilizados para a assepsia devem ser subsequentemente removidos para evitar a contaminação da amostra. Aplicação tópica de cremes anestésicos, quando apropriada, aliviará significativamente qualquer desconforto associado à punção venosa.

Os pesquisadores devem, antes de imobilizar o animal, preparar todos os equipamentos e materiais necessários para diminuir ao máximo o tempo de contenção.

Considerações importantes para a coleta de sangue:

O executor da coleta deve ter capacitação adequada para realizar a atividade naquele animal;

Não se deve puncionar um sítio que apresente inflamação ou hematoma;

Sempre que possível deve se usar técnicas de canulação para coleta de amostras múltiplas.

Locais de coleta de sangue e recomendações para roedores e coelho estão descritos na Tabela1 A.

O método, volume e frequência da coleta devem também levar em consideração fatores associados ao bem-estar do animal. As principais consequências da coleta de sangue que podem afetar o bem-estar do animal são: perda excessiva de sangue, trombose, hematomas e inflamação do vaso.

Os efeitos da perda crônica de sangue são mais discretos que aqueles oriundos da perda de sangue aguda. Esses sinais incluem palidez das mucosas, atividade reduzida, aumento na frequência respiratória e presença de extremidades frias. A perda da massa muscular e diminuição do peso corporal também são observados nos casos de perdas crônicas.

Pequenos volumes removidos frequentemente podem causar anemia. Sempre quando possível é recomendado a reposição de fluidos após coletas de sangue. O recomendado é a reposição de duas vezes o volume retirado por fluidos isotônicos preferencialmente solução Ringer Lactato.

O aquecimento suave da cauda de camundongos e ratos, (recomenda-se envolver a cauda com algodão embebido em água aquecida) reduzirá o tempo de retirada do sangue e conseqüentemente o estresse associado. Entretanto, uma imobilização inadequada prolongará o tempo de retirada de amostras, aumentará os riscos para o animal e reduzirá a qualidade das mesmas.

Quando coletas múltiplas são necessárias, deve-se alternar o local da coleta.

Vias de administração de substâncias

Descrever todas as vias de administração está além do escopo deste documento. Portanto, a ênfase é dada na descrição dos procedimentos mais usuais e aos seus refinamentos.

O procedimento de administração de substâncias pode causar impacto no bem-estar do animal e na validade dos resultados . A experiência, o treinamento, a habilidade da pessoa que administra a aclimatação e o treinamento são aspectos de refinamento que devem ser considerados durante o planejamento de um projeto científico ou didático.

A via escolhida na administração de substâncias testes estabelecerá limites no volume a ser administrado e influenciará na sua biodisponibilidade. As exigências do estudo e o risco potencial aos animais serão fatores-chave na seleção da via.

Treinamento é um pré-requisito fundamental para realização de procedimentos de administração de substâncias. O pessoal que realiza esses procedimentos deve ser experiente e capacitado.

As vias de administração mais utilizadas são descritas a seguir:

Via oral (VO)

Respeitadas as propriedades físicas e químicas, as substâncias podem ser administradas pela água de beber, no alimento ou através da administração orogástrica (gavagem), na qual a substância é introduzida pela boca e depositada diretamente no estômago.

A gavagem permite a administração da dosagem exata. Uma sonda flexível de polietileno, ou uma cânula rígida de aço inoxidável com extremidade em esfera, é cuidadosamente introduzida na boca do animal passando pelo esôfago e chegando ao estômago onde o material é dispensado.

ANEXO I

A gavagem é o método mais preciso dentre os procedimentos por administração oral, porém poderá representar um risco para o bem-estar do animal por ser mais invasivo. Neste método, o volume da substância que pode ser administrado com segurança, bem como as dimensões do aparato de gavagem, depende do tamanho do animal. Como referência, o volume máximo dado por gavagem é 10 mL/kg de peso corpóreo.

A administração pela água de beber ou no alimento deve ser feita com acompanhamento da ingestão desses. É possível que a substância a ser administrada modifique as propriedades organolépticas levando à alteração no padrão de consumo de água ou ração e impactar negativamente o bem-estar animal e/ou o resultado.

Via intravenosa (IV)

É a via em que há a introdução da medicação diretamente na corrente sanguínea e que permite a mais rápida ação do fármaco administrado. Nas espécies em que as veias podem ser acessadas através da pele (percutaneamente), o uso de um anestésico local, como um creme, aplicado na pele no local proposto, deve ser considerado como um refinamento. De acordo com as características das substâncias, elas podem ser administradas rápida ou lentamente. Nas administrações de substâncias e seus veículos por via parenteral, devem ser considerados os seguintes fatores: o volume usado, a estabilidade da formulação, pH, viscosidade, osmolaridade, capacidade de tamponamento, esterilidade e biocompatibilidade da formulação. Devem ser usados tamanhos e calibres de agulhas compatíveis com a espécie animal, considerando-se o calibre do vaso sanguíneo e a velocidade da injeção.

Via intraperitoneal (IP)

A via intraperitoneal é comumente usada em ratos e camundongos, mas pode ser utilizada em outras espécies. Não é necessária anestesia e a injeção é feita no quadrante abdominal inferior do lado direito do animal. Embora injeções IP pareçam seguras, há risco em puncionar o trato intestinal por dificuldade de contenção do animal. Não são indicadas para múltiplas doses e materiais irritantes podem causar peritonite.

Via subcutânea (SC)

A via subcutânea é comumente usada em todas as espécies. As soluções devem ter pH fisiológico e ser isotônicas. As injeções são feitas normalmente no dorso, na nuca ou flanco. O animal não necessita ser anestesiado. A absorção dessa via é lenta, especialmente para soluções oleosas. Nas administrações de doses múltiplas, recomenda-se a alternância do local de administração.

Intramuscular (IM)

O sítio mais utilizado nesta via é o músculo bíceps femoral da coxa, entretanto, a escolha deve considerar a possibilidade de dano às terminações nervosas. A absorção desta via é lenta. Para estudos com múltiplas doses, recomenda-se fazer uma rotação dos sítios. A administração intramuscular pode ser dolorosa porque as fibras estão obrigatoriamente sob a tensão do material injetado.

Outras vias de administração também podem ser acessadas, tais como intra-auricular, transdérmica, intradérmica, intratecal e intraocular. Quando necessária administração contínua de substâncias pode ser feita utilizando-se implante subcutâneo, minibomba osmótica ou cateter venoso de permanência.

Tabela 1B – Métodos e vias comuns de administração de substâncias nos roedores e lagomorfos (sítio de administração, máximo de volume aceito e tamanho da agulha)

Cuidados a serem considerados para administração de substâncias em animais:

A substância e seu solvente líquido devem ser apropriados para a via de administração, a espécie e a finalidade científica. Soluções para injeções devem ter pH próximo de 7,0 para reduzir o risco de dano ao tecido. A ordem de tolerância para uma substância com um pH na faixa entre 4,5 e 8 é: oral>IV>IM>SC. A substância deve ser solúvel em solventes biocompatíveis padronizados, atenção deve ser dada aos tamanhos e calibres de agulhas que devem ser compatíveis com a espécie animal.

A aclimatação ao novo ambiente e treinamento para o procedimento de administração pode minimizar o distresse no animal. Esse procedimento deve ser adotado especialmente quando animais que não estão acostumados ao manuseio devem receber substâncias em mais de uma ocasião. Quando possível, recompensas (reforço positivo) devem ser utilizadas ao treinar os animais para cooperarem com o procedimento. Após receberem a dose, os animais devem ser monitorados para verificar efeitos adversos, dor e distresse.

Contaminação e infecção podem resultar da administração de substâncias indevidamente manipuladas: uso de agulhas e seringas não estéreis, transferência de infecção entre animais por uso comum de equipamentos ou introdução de micro-organismos ao perfurar a pele. A necessidade de preparação da pele deve ser avaliada para cada caso específico. A assepsia da pele pode envolver o corte do pelo e uso de uma solução antisséptica.

Na administração por injeção, identificado o sítio de aplicação, a agulha deve ser inserida firmemente na posição correta e na profundidade exigida.

A lista de sinais de dor e distresse, específica da espécie, deve ser consultada no *checklist* de monitoramento previamente elaborado. Na Tabela 2 encontra-se procedimentos para minimizar a dor e o distresse ao administrar substâncias.

Estudos fetais e embrionários

Estudos fetais e embrionários são amplamente utilizados para conhecer a fisiologia embrionária, fetal e neonatal bem como para validar técnicas de correção de anormalidades fetais em humanos. O conhecimento adquirido da pesquisa fetal e embrionária é utilizado para melhorar a sobrevivência, saúde e bem-estar de animais recém-nascidos bem como para a melhor compreensão da biologia do desenvolvimento. Para estudos com embriões é necessária sua coleta de uma mãe gestante ou pelo desenvolvimento de embriões utilizando técnicas de fertilização *in vitro*.

ANEXO I

O acesso ao feto pode ser feito diretamente via uma incisão abdominal na mãe devidamente anestesiada, com a exposição de parte ou de todo o feto por meio de incisões na parede uterina. O acesso também pode ser realizado indiretamente utilizando-se técnicas de monitoramento como ultrassom ou procedimentos radiológicos, e por técnicas laparoscópicas, estas últimas também necessitando de anestesia.

Os estudos podem envolver coleta de amostras do feto, dos anexos fetais ou do útero além da colocação de cateteres ou instrumentos no feto ou placenta. Todos esses procedimentos exigem anestesia materna, caso não seja *in vitro*.

Independentemente das circunstâncias, esse tipo de procedimento, requer apresentação de justificativa robusta pelo pesquisador responsável e criteriosa análise pela CEUA da instituição, pois o bem-estar do feto e da mãe deve ser considerado quando animais em gestação forem submetidos à cirurgia ou outras intervenções.

Laparotomia com cirurgia uterina causa dor significativa na mãe e pode expor o feto a um estímulo potencialmente nocivo que deve ser levado em consideração no planejamento do procedimento.

Técnicas laparoscópicas - Dor ou distresse maternal

Deve-se assumir que tais procedimentos causarão dor em animais. Qualquer animal que passe por uma laparoscopia deve receber medicação analgésica apropriada para obter uma boa imobilização durante o procedimento e evitar a dor.

Dor e perturbação fetal

Deve-se avaliar o estágio de desenvolvimento do animal e o seu nível de consciência, intervenção cirúrgica no feto poderá causar estímulos potencialmente nocivos a ele.

Primeiramente, o sistema neural necessário para consciência deve estar formado e ativo; os estímulos devem ser capazes de provocar a transmissão de impulsos pelos nervos desde os receptores sensoriais até o cérebro do animal, e suas estruturas cerebrais devem estar operacionalmente preparadas para converter esses impulsos em sensações percebidas. Segundo, o animal precisa estar consciente para perceber sensações, já que a inconsciência anula a percepção. Terceiro, para o animal consciente sofrer e para que o seu bem-estar seja comprometido, a natureza, intensidade e/ou duração das sensações devem resultar em experiências significativamente nocivas ou aversivas.

Há evidência de efeitos a longo prazo das respostas fisiológicas a estímulos dolorosos aplicados em fetos. Essas evidências indicam a necessidade do fornecimento de alívio adequado da dor ao feto. A não ser que aparelhos implantados possam ser utilizados para medir diretamente o bem-estar do feto, qualquer sinal de dor na mãe deve ser considerado como um sinal importante de dor e desconforto potencial para o feto. O feto é mais suscetível à hipotermia durante a cirurgia e há a necessidade de preveni-la.

Controle da dor: anestesia, analgesia e sedativos.

Este item descreve os fármacos anestésicos, analgésicos e sedativos e respectivas técnicas recomendadas para as principais espécies (rato, camundongo, cobaia, coelho e hamster) de fins científicos.

É de fundamental importância uma equipe qualificada para reconhecer os sinais de dor. O veterinário é responsável pelos planos anestésicos e pela monitoração da profundidade anestésica na espécie alvo.

A dor resulta em alterações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais significativas e indesejáveis ao animal e aos estudos científicos. Aliviar a dor de forma eficaz acelera o retorno à homeostasia após os procedimentos cirúrgicos. Em muitos casos outras estratégias, além da farmacológica, devem ser incluídas no controle da dor, além dos cuidados pós-anestésicos específicos.

O uso de agentes anestésicos, analgésicos e sedativos deve ser adequado à espécie, apropriado para o propósito do estudo e consistente com a prática veterinária atual. Os procedimentos cirúrgicos devem ser realizados mediante anestesia local ou geral apropriada. O controle eficaz da dor é obrigatório quando um animal se recupera da cirurgia. Deve-se atentar para a preparação pré-anestésica do animal, a monitoração da profundidade anestésica, os cuidados pós-anestésicos e o alívio da dor e estresse. Para selecionar um protocolo de tratamento da dor, deve-se levar em conta que a dor e estresse não são avaliados facilmente em animais, desta forma os pesquisadores devem pressupor que os animais sentem dor de forma similar aos humanos.

- **Seleção do protocolo de anestesia**

O agente anestésico, analgésico ou sedativo selecionado deve ser seguro para o animal e para quem administra e interferir o mínimo possível no protocolo de pesquisa. Deve ser considerado os seguintes fatores antes da seleção do protocolo analgésico e anestésico:

- interações fisiológicas e influência nos resultados dos fármacos utilizados, lembrando que apenas em situações extremas, plenamente justificadas, com embasamento científico, os opioides ou AINES não sejam utilizados;

- espécie, linhagem, raça, idade e estado fisiológico do animal (ex.: prenhez, estado de saúde);

- grau de invasividade e duração da dor ou estresse, se for o caso;

- plano ou profundidade necessários da anestesia;

- se o estudo é terminal ou não;

- duração da anestesia;

- aspecto humanitário da técnica (ex.: facilidade de indução e recuperação da anestesia, efeitos adversos dos fármacos nos animais);

- métodos de administração e dosagens;

- experiência dos pesquisadores com a técnica (incluindo um veterinário com experiência apropriada;

- disponibilidade de técnicas de monitoração anestésica (incluindo número adequado de pessoal treinado);

- monitoração necessária durante o período de recuperação;

segurança dos pesquisadores;
equipamentos disponíveis.

Os Grupos farmacológicos de sedativos (não analgésicos), sedativos e analgésicos, anestésicos dissociativos estão relacionados na Tabela 3 e os anestésicos injetáveis e de inalação gerais Tabelas 4 e 5.

Figura 1 - Exemplo de opções de controle da dor classificados de acordo com o potencial do procedimento em resultar dor ou estresse ("grau de invasividade")

Questões específicas a considerar

Há variações significativas na resposta a agentes anestésicos, analgésicos e sedativos de acordo com a espécie, linhagem e sexo do animal. Também pode haver variações individuais consideráveis entre animais de mesma linhagem e sexo. Não se recomenda extrapolar os efeitos de um agente anestésico ou analgésico de uma espécie para outra, incluindo humanos. Deve-se consultar orientação especializada ao planejar um novo protocolo de anestesia e controle da dor.

Para minimizar as interações potenciais com o protocolo de pesquisa, os efeitos farmacológicos dos agentes devem ser revisados. É importante considerar a resposta sistêmica ao procedimento anestésico, os efeitos do procedimento em si (ex.: canulação, cirurgia), da monitoração anestésica (ex.: hipotermia, ventilação e perfusão tecidual inadequadas) ou de um controle inadequado da dor no pós-operatório, que podem produzir efeitos indesejados e afetar os dados da pesquisa.

Anestesia

Para a supressão da percepção da dor durante a realização de um procedimento deve-se realizar anestesia geral ou local. Essa seção discute sobre a seleção da técnica de anestesia mais apropriada e os passos para controle da anestesia.

Anestesia geral

A anestesia geral pode ser realizada com anestésicos injetáveis e ou inalatórios. A indução anestésica é o período entre o estado consciente e o estado de anestesia cirúrgica (inconsciência ou dissociação, quando se usar anestésicos dissociativos). A anestesia deve preceder o início do procedimento, se manter durante a cirúrgica até o início do período de recuperação.

A anestesia geral envolve perda de consciência e sensação dolorosa e relaxamento muscular. O grau e necessidade de depressão da atividade reflexa, do tônus muscular e sistema nervoso central varia com o procedimento a ser realizado. A anestesia geral com perda da consciência não garante analgesia eficaz, já que a inconsciência apenas evita a percepção de dor somente enquanto o animal está sob anestesia. Entretanto, os estímulos nocivos são transmitidos e processados pelo sistema nervoso central, durante os atos cirúrgicos e podem desencadear hipersensibilidade central e produzir dor crônica e/ou neuropática. Portanto, embora a

ANEXO I

percepção de dor esteja ausente enquanto o animal está inconsciente, tal percepção pode estar aumentada no pós-operatório, quando não se tomam medidas antinociceptivas ou analgésicas no pré e trans-operatório. Outro ponto a se considerar é o grau de depressão do sistema nervoso central que os anestésicos ou as diferentes associações devem promover para que ocorra a insensibilidade durante o procedimento.

Anestesia inalatória

Pode ser induzida por meio de máscara facial e mantida por meio de máscara facial ou tubo endotraqueal. Para prevenir ou minimizar a exposição indesejada do operador aos gases anestésicos, deve-se prover, no recinto, um sistema eficiente de exaustão.

Para se administrar a anestesia inalatória usa-se equipamentos anestésicos específicos, com fluxo diluente de oxigênio, com ou sem ar comprimido para fins medicinais, e vaporizadores, para controle da concentração do agente inalatório utilizado. Em animais de peso até 7 kg recomenda-se o uso de circuito avalvular, antigamente denominado “aberto”, como por exemplo, o circuito de T de Ayre, ou coaxial de Bain ou Mapleson A ou D, entre outros, já que são circuitos de baixa resistência e pequeno espaço morto.

O uso de uma caixa ou vidro, onde o animal é colocado dentro de uma câmara contendo uma gaze ou algodão embebido do líquido anestésico, não deve ser usado, pois a concentração de anestésico atingida dentro do recipiente é imprevisível e apresenta risco de óbito quando se usa anestésicos de fácil vaporização (ex.: isoflurano, sevoflurano). Além disso, o contato direto com o líquido anestésico é desagradável para o animal, por causar irritação das membranas mucosas, bem como não é seguro para o operador.

Máscara facial

As máscaras faciais são utilizadas para induzir e manter a anestesia e fornecer oxigênio suplementar para animais anestesiados ou para aqueles que se recuperam da anestesia. A indução anestésica por máscara pode ser utilizada como alternativa à indução em câmara anestésica. Quando a primeira for usada, inicia-se sem o anestésico, para que o animal se acostume a respirar com o aparato apenas com oxigênio, em seguida aumenta-se gradualmente, a partir de zero, a concentração do anestésico inalatório, até a concentração apropriada compatível com o plano anestésico almejado. Em seguida pode-se intubar a traqueia ou continuar a usar a máscara facial. A concentração é então reduzida para o que for adequado para manutenção anestésica, mais detalhes na Tabela 5.

Câmara anestésica

Há câmaras anestésicas comercialmente disponíveis. O animal é colocado na câmara e o agente inalatório administrado com alto fluxo de oxigênio (5 litros ou mais por minuto), até que o animal perca o reflexo postural. O animal é então retirado da câmara e entubado ou mantido com uma máscara facial para a manutenção da anestesia.

Vantagens da anestesia inalatória:

- relativamente simples de administrar;
- controle mais preciso da profundidade da anestesia;
- indução e recuperação rápidas;

ANEXO I

-a provisão de oxigênio resulta em maior concentração de oxigênio no sangue durante a anestesia.

Desvantagens da anestesia inalatória:

- necessidade de equipamento específico;
- necessita boa ventilação e sistema de exaustão no recinto, para a segurança do operador.

Anestesia injetável

Para informações sobre os métodos de administração de agentes anestésicos injetáveis, consultar procedimento "Administração de substâncias".

Administração de anestésicos e via de predileção

Intravenosa (IV) - Na maioria das circunstâncias, de um terço à metade da dose calculada de anestésico é injetada rapidamente (normalmente por um período de 5 a 10 segundos) e complementada, se necessário, por anestesia adicional para produzir o efeito desejado. Após a indução IV, a anestesia pode ser mantida com anestesia inalatória ou IV contínua. Esta via apresenta como vantagem a indução rápida da anestesia e permite que a dose administrada possa ser adaptada para o animal visando atingir e manter a profundidade desejada de anestesia. Entretanto, não podemos deixar de ressaltar que esta via requer muita experiência por parte do operador, uma perfeita imobilização do animal, para que não seja estressante ou recomenda-se a sedação prévia. Alguns agentes anestésicos são citotóxicos se administrados por via perivascular (ex. Propofol, Barbitúricos).

Intraperitoneal (IP) - Quando a via IP é utilizada, o início da ação é mais lento do que com a administração IV e o animal pode passar por uma fase de progressiva ataxia ("cambaleante"). Pode exibir excitação e hiperatividade, para em seguida perder a habilidade de se endireitar, e finalmente perder a consciência. A anestesia fica progressivamente mais profunda até a perda do reflexo interdigital após estímulo doloroso. A vantagem da escolha desta via é ser relativamente simples de administrar. Podemos citar alguns pontos negativos para a escolha desta via, tais como a dificuldade de ajustar a dose, de acordo com a resposta individual do animal, pode ocorrer a sobredosagem ou subdosagem acidental. Quase sempre são administradas doses relativamente grandes de anestésicos para produzir o efeito necessário, sua absorção é lenta se comparada com a administração IV. Efeitos residuais dos fármacos podem persistir por um longo tempo, portanto a recuperação total pode ser prolongada. Doses repetidas podem causar aderências abdominais e há risco considerável de injeções nos órgãos e vísceras.

Subcutânea (SC) - Normalmente utilizada apenas para administrar sedativos. O início da ação é mais lento quando comparado com outras vias de injeção. É relativamente simples de administrar, entretanto alguns fármacos (ex.: pentobarbital, tiopental) não podem ser administrados, pois causam dano ao tecido e escamação da pele. As desvantagens citadas para injeções IP também se somam a esta via.

Intramuscular (IM) - As injeções por esta via são dolorosas e devem ser evitadas sempre que possível. Volumes maiores devem ser administrados em múltiplos locais. O êmbolo deve ser retraído antes da injeção para evitar injeção IV. Sua escolha na maioria das vezes é por ser relativamente simples de administrar. Entretanto, a injeção de um composto irritante pode

ANEXO I

causar dor ou estresse ao animal. Há relatos de reações teciduais e miosite com a administração IM de alguns fármacos (ex.: quetamina). Em animais pequenos, o volume de injeção é grande se comparado ao volume de massa muscular, o que pode resultar em dor ou desconforto. Deve-se evitar em pequenos roedores. As desvantagens citadas para injeções IP também se aplicam a esta via.

Anestesia local

A anestesia local envolve a perda de sensação em uma área delimitada como resultado do bloqueio das terminações nervosas. Utiliza-se durante um procedimento cirúrgico ou para contribuir no controle da dor durante o período pós-operatório. Para procedimentos simples, como cateterização e procedimentos estereotáxicos, cremes ou pomadas de anestésicos locais podem ser aplicados topicamente na pele. Colírios com anestésicos locais podem ser utilizados em exames oftalmológicos.

A anestesia local para procedimentos cirúrgicos é mais usada quando o animal já está acostumado ao manuseio e pode ser imobilizado seguramente. Os anestésicos locais, como a lidocaína, podem ser infiltrados na área alvo, ou injetados por via perineural, correspondente à inervação local da área a ser anestesiada. Além das vias tópica, infiltrativa e perineural, outras vias que podem ser utilizadas incluem a epidural, intratecal ou subaracnoide e intra-articular.

A anestesia local pode ser associada aos anestésicos injetáveis ou inalatórios, para impedir a transmissão da dor (estímulo nociceptivo) oriunda do sítio cirúrgico (ver "Analgesia multimodal ou balanceada").

Técnicas especializadas

Anestesia reversível - Muitos regimes de anestésias injetáveis envolvem períodos de recuperação prolongados, como por exemplo, em roedores, nos quais os anestésicos administrados pela via IP produzem em média 30 a 60 minutos de anestesia seguidos de tempo de recuperação de 2 a 4 horas. Durante o período de recuperação, os animais permanecem suscetíveis à hipotermia e apresentam algum grau de depressão cardiorrespiratória. Esses efeitos podem ser superados ao se utilizar antagonistas. Os antagonistas como a naloxona estão disponíveis para opioides, bem como há a alternativa de utilizar agonistas-antagonistas (ex.: butorfanol e nalbufina), para reverter os efeitos adversos dos opioides agonistas totais (ex.: morfina, metadona). Os agonistas adrenérgicos- α_2 , como a medetomidina e xilazina, podem ser revertidos pelos antagonistas ioimbina, tolazolina e atipamezol e as benzodiazepinas, pelo flumazenil.

Anestesia neonatal - A anestesia de animais recém-nascidos é um desafio, dada a capacidade reduzida de biotransformação e eliminação dos fármacos. Desta forma a resposta aos anestésicos pode diferir consideravelmente dos adultos. A recuperação prolongada pode reduzir os estoques de glicogênio hepático e resultar em hipoglicemia (baixa concentração de glicose no sangue). Outros problemas são a maior suscetibilidade à hipotermia, maior possibilidade de má função pulmonar e circulatória e a rejeição pela mãe após o procedimento (especialmente em roedores). Por essas razões, é preferível utilizar anestesia por inalação (ex.:

isoflurano) para que a recuperação seja rápida e a alimentação normal seja reiniciada tão logo quanto possível.

Cuidados gerais para a eficácia da anestesia

O controle eficaz da dor depende dos cuidados com o animal antes da indução da anestesia, do desempenho do procedimento, da monitoração da eficácia da anestesia durante o procedimento e dos cuidados com o animal após o procedimento e recuperação.

Pré-anestesia - Deve-se aclimatar o animal ao manuseio para reduzir os efeitos do estresse e a possibilidade de acidentes com o animal e o operador durante a indução. Avaliar se o animal está saudável, registrar o peso corporal, para ajudar na monitoração anestésica e no cálculo das doses. Em algumas situações, o registro de consumo de alimento e água antes do procedimento auxiliará na monitoração pós-operatória.

Jejum - O período de jejum pré-anestésico é espécie-específico. Em roedores pequenos e coelhos é geralmente desnecessário, pois o vômito durante a indução não ocorre nessas espécies. Além disso, o jejum pode resultar em depleção de reservas de glicogênio e causar hipoglicemia. Alguns autores só recomendam o jejum em coelhos em casos de cirurgia no sistema digestório. Coelhos e roedores são coprofágicos (ingerem suas próprias fezes), portanto medidas para prevenir a ingestão de fezes são necessárias se o estômago precisar estar vazio para o protocolo de pesquisa. Deve-se ter especial atenção com as cobaias, pois cerca de 40% de seu peso vivo é ingesta.

Ao induzir um animal e monitorar a profundidade da anestesia, deve-se estar ciente dos estágios anestésicos. O tempo gasto para um animal passar por cada estágio depende do agente anestésico utilizado e da resposta do animal. A anestesia pode ser induzida por agentes inalatórios ou injetáveis. Seja qual for a técnica escolhida, a anestesia deve ser administrada com equipamento apropriado, em uma sala específica, sem a presença de outros animais.

A anestesia pode ser mantida por agentes inalatórios administrados via máscara facial ou tubo endotraqueal, infusão contínua de agentes injetáveis, ou uma associação de métodos. Mesmo durante breves períodos de anestesia, é importante dar atenção ao suporte das funções corporais vitais do animal, particularmente os sistemas cardiovascular e respiratório.

Após a indução anestésica, posicionar o animal com sua cabeça e região cervical em extensão para minimizar a obstrução das vias aéreas. Nos casos de intubação traqueal é necessário garantir uma via aérea adequada, especialmente para procedimentos longos. Para isso é essencial a familiaridade com a anatomia específica da espécie e com a técnica.

A hipotermia (redução da temperatura corporal) pode se desenvolver rapidamente durante a anestesia e é uma das causas mais comuns de óbito por anestesia, especialmente em animais menores como roedores, que perdem calor rapidamente sob anestesia cirúrgica, dada a alta proporção da superfície corporal em relação ao peso. Deve-se manter a temperatura do corpo o mais próximo possível do normal, pela provisão de calor suplementar (ex.: bolsas quentes,

ANEXO I

colchões térmicos). Por outro lado, deve-se tomar cuidado para não superaquecer ou queimar o animal.

Para manter a hidratação, a infusão IV ou SC de fluidoterapia (ex.: Ringer com lactato) é especialmente importante em anestésias longas ou cirurgias invasivas. Os fluidos devem ser aquecidos para não contribuírem para a hipotermia.

Sob anestesia, os olhos dos animais frequentemente ficam abertos, portanto, deve-se garantir que a córnea esteja protegida de ressecamento e trauma, por meio de uso de pomadas oftálmicas.

A posição do animal deve ser monitorada, para evitar compressão exacerbada de partes ou de todo o corpo. Também é importante evitar o excesso de alongamento ou imobilização dos membros, pois há risco de danos nos nervos e vasos sanguíneos. Quando possível, permitir que os membros fiquem em uma posição anatômica natural. Quando os animais estão anestesiados ou imóveis por longos períodos, é recomendado que o animal seja movido ou virado a cada 20 minutos para promover o fluxo normal de sangue nos tecidos da superfície inferior.

Pré-medicação - A pré-medicação é geralmente administrada 5-30 minutos antes dos agentes anestésicos. A grande vantagem do emprego destes fármacos é a potencialização da ação dos anestésicos obtendo-se desta forma plano mais adequado de anestesia além de significativa redução da dose dos agentes anestésicos gerais. Os agentes empregados na pré-medicação podem incluir:

- Analgésicos administrados antes de um procedimento para inibir a nocicepção e percepção de dor e, portanto, para prevenção de dor. Opióides como a morfina, meperidina, tramadol, butorfanol e mesmo o fentanil podem ser utilizados para este fim. No caso da neuroleptoanalgesia esses agentes podem ser associados a um sedativo (ex.: acetilpromazina + butorfanol).

- Sedativos (ex.: acetilpromazina, diazepam) em algumas espécies facilitam a imobilização. A acepromazina na dose de 3mg/kg como medicação pré-anestésica em camundongos, por exemplo, minimiza a ocorrência de excitação inicial que normalmente se observa quando se associa xilazina e quetamina nesta espécie, além de propiciar melhor plano de anestesia.

- Anticolinérgicos (atropina ou glicopirrolato), para reduzir os efeitos adversos de agentes anestésicos, como por exemplo, reduzir as secreções respiratórias e o estímulo parassimpático cardiovascular. Algumas espécies como os coelhos podem ser refratários à atropina requerendo doses de até 2mg/kg para serem efetivas.

Profundidade da anestesia

O controle de monitoração e as técnicas empregadas são determinadas pela espécie e tipo de procedimento. Os pesquisadores devem se familiarizar com os sinais específicos da espécie e dos estágios da anestesia. No mínimo deve-se monitorar e registrar em fichas a profundidade da anestesia pela presença ou ausência de reflexos. Anestesia cirúrgica é obtida quando os seguintes reflexos e tônus muscular normal estão ausentes:

ANEXO I

- reflexo postural: o animal não tenta se endireitar se colocado em decúbito dorsal;
- tônus muscular da mandíbula;
- reflexo palpebral ao toque na pálpebra;
- reflexo interdigital quando o espaço interdigital é pinçado;
- reflexo de pinçamento da cauda: ratos e camundongos;
- reflexo ao pinçamento na orelha: cobaia, coelhos;
- tônus do esfíncter anal;

Sistema respiratório a monitoração mais usual é realizada por:

- observações clínicas: monitora-se a amplitude, frequência e padrão da respiração (aumento na amplitude e diminuição da frequência se intensifica com o aprofundamento da anestesia);
 - monitor respiratório: alguns equipamentos podem não ser sensíveis o suficiente para detectar apnéia em espécies pequenas como o rato ou camundongo, entretanto há equipamentos disponíveis comercialmente para tal;
 - oximetria do pulso: mede a saturação de oxigênio no sangue arterial;
 - capnometria e capnografia: mede a concentração expiratória final de CO₂;
 - hemogasometria: pH e pressão parcial de O₂ e CO₂ no sangue venoso ou arterial, com cálculo automático da concentração de bicarbonato, CO₂ total e déficit ou excesso de bases;
- A obstrução respiratória pode ser causada por secreções, objetos externos, língua ou posições anormais do pescoço. A respiração pode ser comprometida por compressão do tórax.

Sistema cardiovascular a monitoração mais usual é realizada por:

- observações clínicas: cor das membranas mucosas, tempo de preenchimento capilar, sons cardíacos e frequência cardíaca, qualidade de pulso periférico;
- eletrocardiograma;
- pressão sanguínea: pressão arterial sistêmica, pressão venosa central;
- débito cardíaco.

Temperatura do corpo

A temperatura do corpo pode ser monitorada por um termômetro retal, ou termômetro de infravermelho, em que se aponta o feixe de infravermelho para a cavidade bucal ou o abdômen e se obtém o registro da temperatura corporal. A habilidade do animal de regular a temperatura é reduzida até que se recupere da anestesia. Em sua forma mais branda, a hipotermia aumenta o período de recuperação anestésica e pode alterar o metabolismo. Quanto maior a hipotermia, maior a suscetibilidade do animal à sobredosagem anestésica e choque. Portanto, a temperatura ambiente da área de recuperação deve ser de 30-35°C para roedores pequenos. Pode se fornecer calor suplementar (ex.: lâmpadas de aquecimento, bolsas quentes, incubadora, colchão térmico), mas deve-se tomar cuidado para não sobreaquecer o animal. A provisão de zonas aquecidas e não aquecidas na área de recuperação permitirá que o animal escolha sua zona preferida após a recuperação. A temperatura do corpo do animal durante o período de recuperação pós-anestesia e a temperatura do ambiente devem ser monitoradas.

Período pós-anestésico - deve-se observar os animais durante a recuperação de anestesia para garantir que:

- as vias respiratórias não sejam obstruídas
- a temperatura do corpo seja mantida
- eles não se machuquem
- a dor pós-operatória seja adequadamente controlada.

Quando se utiliza os anestésicos inalatórios, o animal deve receber oxigênio puro após o fim do procedimento, para que o agente anestésico seja exalado pelos pulmões e a oxigenação garantida aos tecidos.

Uma vez colocado, deve-se remover o tubo endotraqueal só quando retornar o reflexo laringotraqueal.

Deve-se alojar individualmente os roedores pequenos e outras espécies sociais durante a recuperação, para evitar ataques de companheiros de gaiola e para prevenir a perturbação dos outros animais. No caso de cirurgia, o leito na gaiola deve ser adequado para prevenir contaminação da ferida cirúrgica.

Se os animais tiverem passado por um procedimento invasivo, uma monitoração cuidadosa, durante o período pós-operatório, é essencial para avaliar se a analgesia foi eficaz e se analgesia adicional é necessária. A dose ou frequência de administração deve ser modificada de acordo com as necessidades do animal.

Os líquidos aquecidos (37°C) auxiliam na recuperação do animal. Líquidos apropriados (ex.: Ringer com lactato, solução fisiológica) podem ser administrados IV lentamente, por via subcutânea ou intraperitoneal em uma dose de até 3-4% do peso corporal do animal.

Analgesia

Os agentes analgésicos mais indicados para procedimentos cirúrgicos são os opioides e os anti-inflamatórios não esteroides (AINE). Os anestésicos locais podem ser utilizados para aliviar a dor no pós-operatório, por bloquearem as sensações de dor da área afetada. O protocolo de analgesia pode também incluir o uso de antagonistas receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (ex.: quetamina em doses subanestésicas), sedativos ou tranquilizantes.

A via oral pode ser utilizada para a administração de fármacos em dose única ou múltiplas (ex.: tratamento analgésico contínuo fornecido via tabletes, ou em alimento, água ou gelatina). Entretanto, deve-se ter especial atenção quando da administração de agentes na água, pois vários agentes empregados para este fim possuem gosto amargo, e na maioria das vezes o consumo adequado de água não ocorre, especialmente se o animal já estiver com dor.

Analgesia preventiva ou protetiva

A dor pós-operatória é controlada mais prontamente quando se realiza a analgesia no pré-operatório. Isso é conhecido como analgesia preventiva ou protetiva, administrada antes da incisão e continuamente durante o tempo no qual os sinais nociceptivos são maiores (aproximadamente 6-36 horas no pós-operatório para a maior parte das cirurgias). A analgesia protetiva previne o estabelecimento de sensibilização periférica e central causada por lesões incisionais e inflamatórias e cobre o período de cirurgia e o pós-operatório imediato.

Ao se administrar AINE no pré-operatório, deve-se dar preferência por inibidores preferenciais (carprofeno e meloxicam) e seletivos da ciclooxigenase 2 (coxibes), para minimizar a inibição de plaquetas e hipoperfusão renal.

Analgesia multimodal

A percepção de dor envolve uma multiplicidade de vias nociceptivas, mecanismos e sistemas transmissores (Figura 2). Portanto, é improvável que uma única classe de analgésicos alivie completamente a dor, independentemente da dose utilizada.

Normalmente recomenda-se associar opioides e AINE. O opioide diminui a transmissão nociceptiva periférica e central aferente. Em contraste, os AINE agem periféricamente para diminuir a inflamação local e a informação nociceptiva para o sistema nervoso central como resultado de inflamação. Adicionar um anestésico local injetável (ex.: lidocaina, bupivacaína) fornece analgesia adicional, pelo bloqueio da transmissão nervosa periférica da área em questão.

Utilizam-se os antagonistas do receptor NMDA (ex. quetamina) para reduzir a sensibilização central. Sedativos e tranquilizantes diminuem a ansiedade e o estresse, que comprovadamente elevam as respostas à dor.

Figura 2 – Locais de ação de agentes analgésicos nos mecanismos da dor

Fonte: Schofield e Williams (2002)

<http://www.biosecurity.govt.nz/animal-welfare/analgesic-practice.htm>

Monitoração da analgesia

Deve-se monitorar os animais cuidadosamente durante o pós-operatório para avaliar se a analgesia foi eficaz e se analgesia adicional é necessária. Deve-se modificar a dose ou frequência de administração de acordo com as necessidades do animal. Descreve-se, a seguir, as recomendações sobre a rotina de uso dos analgésicos, agentes a serem utilizados e a frequência de administração:

- Procedimento relativamente pequeno (ex.: cateterização vascular): uma dose única de analgésico sistêmico é administrada, seja um opioide ou um AINE. Alternativamente, pode ser apropriado, em algumas situações, injetar um anestésico local de longa duração (ex.: bupivacaína) na pele e tecidos circunjacentes.
- Procedimentos cirúrgicos mais invasivos (ex.: laparotomia): a administração de analgésicos sistêmicos (AINE e opioide) é recomendada por 72 horas.

Ansiolíticos

A ansiedade pode elevar as respostas à dor e, desta forma, recomenda-se usar sedativos, que também facilitam a anestesia. Geralmente não se utilizam sedativos para produzir sedação profunda ou hipnose. O efeito máximo deve ser observado antes da indução da anestesia.

Manuseio seguro de analgésicos

Por serem entorpecentes, a maioria dos agentes anestésicos e analgésicos são fármacos controlados e devem ser armazenados em um armário trancado, em uma área segura. A legislação pertinente rege a aquisição, o uso e a manutenção de registros destas substâncias.

Alguns fármacos também se associam a questões significativas de saúde e segurança ocupacionais (ex.: riscos à saúde associados à exposição crônica aos anestésicos inalatórios, como potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico). Os pesquisadores devem estar cientes de qualquer risco potencial associado aos agentes que utilizam e tomar as precauções devidas.

Na escolha de anestesia dissociativa para um procedimento cirúrgico, salienta-se a importância de não se usar o anestésico dissociativo (ex. quetamina ou tiletamina) isoladamente ou apenas em associação com um benzodiazepínico (ex. midazolam, diazepam, zolazepam), já que, apesar de ocorrer imobilização do animal, não há uma analgesia efetiva para o procedimento cirúrgico. Nestes casos deve-se associar ao anestésico dissociativo, um alfa-2 agonista (ex. xilazina, medetomidina) e um opioide.

Para garantir que o bem-estar animal seja mantido durante a pesquisa científica, este guia orienta os usuários a lançarem mão de todos os recursos objetivando minimizar a dor e o estresse aos animais. Procedimentos e protocolos de controle da dor consistentes, planejamento detalhado de procedimentos cirúrgicos e de outros procedimentos potencialmente dolorosos, uma compreensão da biologia animal e conhecimento detalhado das ações fisiológicas e farmacológicas dos fármacos sedativos, analgésicos e anestésicos propostos para o uso nestas circunstâncias, devem estar disponível antes de qualquer manipulação que possa causar dor aos animais.

8. Procedimentos cirúrgicos

Define-se procedimento cirúrgico como uma intervenção que requer acesso a um tecido vivo. No cenário científico, o tipo de procedimento dependerá do propósito científico e pode variar desde uma incisão superficial até a penetração de uma cavidade do corpo, intervenção em órgão(s) ou dissecação tecidual extensa.

Os procedimentos cirúrgicos são realizados por diversas razões:

- coletar tecidos;
- realizar biópsias (incisional ou excisional);
- inserir cateteres vasculares de longa permanência (portal vascular) para permitir a coleta de sangue de animais;
- inserir cateteres para monitorar a pressão sanguínea venosa ou arterial;
- infundir substâncias e/ou fármacos;
- implantar cateteres ou aparelhos para coletar outros fluidos corporais;
- implantar eletrodos para registrar ou estimular locais específicos em estudos neurofisiológicos;
- implantar equipamentos, como sondas de telemetria para monitoração fisiológica e comportamental prolongada;
- transplantar órgãos, seja no mesmo indivíduo (autólogo), seja em indivíduos da mesma espécie (homólogo) ou em espécies diferentes (xenólogo ou heterólogo), no mesmo local (ortotópico) ou em locais diferentes (heterotópico) no animal receptor;
- desenvolver um modelo de estudo para um processo fisiológico ou patológico;
- desenvolver e avaliar novas técnicas cirúrgicas para utilização posterior em animais e humanos.

Qualquer procedimento cirúrgico deve ser acompanhado de anestesia e analgesia apropriadas para o tipo de procedimento, bem como, a espécie envolvida. Dependendo dos objetivos do estudo, ao final do procedimento cirúrgico, os animais podem recuperar a consciência ou não. No segundo caso, o animal deve sofrer eutanásia no final do procedimento.

Quando um animal se recupera de uma intervenção cirúrgica, precauções especiais devem ser tomadas para minimizar o risco de complicações, tais como dor ou infecção no pós-operatório. A natureza dos procedimentos cirúrgicos coloca o bem-estar de um animal em risco significativo, mais frequentemente associado ao controle inadequado da dor tanto durante como após o procedimento.

Técnica asséptica

A cirurgia asséptica é definida como intervenção realizada de formas e por meios suficientemente livres de micro-organismos para que não se desenvolvam infecções. Procedimentos assépticos devem sempre ser utilizados, principalmente, quando se objetiva conseguir resultados após o procedimento cirúrgico.

A cirurgia asséptica é definida como uma intervenção em que se realiza um conjunto de medidas (esterilização do instrumental, desinfecção do ambiente, antissepsia do campo cirúrgico e equipe) com a finalidade de evitar a contaminação/infecção em locais sem contaminação.

Por alguns anos, havia uma visão de que procedimentos assépticos não eram necessários quando procedimentos de recuperação eram realizados em roedores. Hoje se sabe que uma boa técnica cirúrgica é tão importante quanto a assepsia na prevenção de infecções trans- e pós-cirúrgicas em roedores.

Os elementos de técnica asséptica envolvem:

- realização de procedimentos cirúrgicos em uma determinada área em que foi feita a antissepsia;
- preparação do sítio operatório para minimizar o risco de entrada de bactérias na ferida; isto normalmente envolve a remoção de cabelo, pelo ou lã nas imediações da ferida cirúrgica pretendida e a limpeza e desinfecção daquela área;
- cirurgião e assistentes cirúrgicos devem utilizar aventais cirúrgicos e luvas estéreis (apenas luvas podem ser utilizadas em intervenções cirúrgicas em roedores e a campo) para efetuar a higienização cirúrgica;
- local da intervenção cirúrgica deve estar delimitado por campos estéreis para criar um "campo" estéril adjacente; um método de cobertura dupla é utilizado para procedimentos cirúrgicos grandes da cavidade abdominal ou torácica ou quando houver intervenção em vísceras;
- utilizar instrumentos e kits estéreis;
- somente instrumentos, campos cirúrgicos, kits e luvas estéreis devem entrar em contato com o campo operatório;
- superfícies estéreis devem ser mantidas secas para evitar que a umidade contamine a área cirúrgica.

ANEXO I

A saúde clínica de todos os animais deve ser checada alguns dias antes da intervenção cirúrgica ser executada; atenção especial para sinais de respiração ou função cardiovascular comprometidas ou de infecção intercorrente. Além disso, quando os procedimentos estiverem propensos a comprometer sua habilidade em responder a infecções (ex.: imunossupressão), os animais devem ser examinados quanto a infecções subclínicas.

Os efeitos do transporte, introdução em novas instalações, novos grupos sociais e novo cuidador (técnico), sobre a resposta ao estresse (juntamente com alterações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais) são bem documentados. O estresse cirúrgico exacerbará essas alterações, e não somente comprometerá a habilidade do animal de manter a homeostase durante o procedimento cirúrgico, mas aumentará o risco de infecções no pós-operatório ao comprometer a função imunológica. Um período de aclimação deve ser dado, para garantir que o animal tenha se recuperado desses estressores antes que seja marcada a intervenção cirúrgica. Este tempo pode variar com as circunstâncias, mas é recomendado um mínimo de 10-14 dias para animais criados em laboratório.

Atenção especial deve ser dada durante ou imediatamente após uma intervenção cirúrgica, especialmente aos seguintes eventos:

- perda de sangue devido a um trauma no tecido ou controle inadequado da hemorragia resultando em perfusão e oxigenação comprometidas do tecido e, se for grave, em colapso cardiovascular;
- desidratação devido à perda descompensada de líquido durante o procedimento cirúrgico, que será exacerbada pela exposição e ressecamento dos tecidos, consumo restrito de fluido no pré-operatório e consumo voluntário reduzido no período pós-operatório;
- hipotermia devido ao comprometimento da termorregulação pelos agentes anestésicos, o que é um grande risco em pequenos roedores que possuam área de superfície extensa em relação à massa corporal e uma alta taxa metabólica;
- hipóxia e má perfusão tecidual (i) como consequência do decréscimo no volume de sangue, desidratação, desequilíbrio ácido-base ou hipotermia, ou (ii) associada com função respiratória inadequada;
- distúrbios metabólicos devido à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e mudanças associadas na função celular, com metabolismo alterado de glicose e proteína resultando em hiperglicemia e balanço nitrogenado negativo;
- falência cardiovascular e/ou respiratória, riscos durante procedimentos cirúrgicos e no período pós-operatório imediato, não somente devido às complicações potenciais listadas anteriormente, mas também porque muitos agentes anestésicos possuem efeitos depressivos significativos e específicos em ambos os sistemas, um risco exacerbado por mau gerenciamento da dose anestésica;
- choque-hipovolêmico ou séptico.

Infecções no pós-operatório podem incluir infecção e ruptura da ferida causada por uma falha nas técnicas assépticas; ou podem ser resultado de um trauma excessivo no tecido, má homeostase, aparelhos, cateteres, os quais podem ser um receptáculo de infecção. A hipotermia e agentes anestésicos modulam a resposta imune e aumentam o risco de infecção após procedimentos cirúrgicos.

A demora na cura do ferimento ou deiscência pode resultar de um ou mais dos seguintes fatores:

ANEXO I

- infecção;
- comprometimento da viabilidade tecidual associada a uma má perfusão tecidual ou dano excessivo ao tecido causado por (i) mau manuseio do tecido, (ii) falha em manter um suprimento de sangue adequado, ou (iii) desidratação de tecidos durante a intervenção cirúrgica;
- má posição de órgãos ou tecidos durante o fechamento;
- escolha inadequada de materiais e/ou métodos de sutura, o que impede a perfusão tecidual e pode resultar em má posição dos tecidos e um maior risco de o animal acidentalmente remover as suturas (observação: inflamação do local da ferida aumentará este risco);
- cura comprometida devido à função imunológica suprimida, seja como parte de uma intervenção deliberada (por exemplo, quando um animal é imunossuprimido após um transplante de órgão ou tem função imunológica suprimida devido à seleção genética ou manipulação genética), seja por associação com uma complicação perioperatória como hipotermia.

Complicações com cateteres ou aparelhos implantados são mais frequentemente devido a:

- (i) o desenvolvimento de uma infecção no local do implante onde o cateter ou aparelho é a fonte de uma infecção sistêmica ou (ii) uma infecção na pele que se desenvolve no ponto de saída de um cateter ou sonda, que pode resultar em infecção sistêmica rastreando o cateter ou aparelho ou um túnel subcutâneo, ou (iii) a introdução sistêmica de um patógeno durante a lavagem de cateteres;
- vazamento de conteúdo gastrointestinal ao redor de uma fístula externa causando supuração da pele ao redor;
- cateteres, eletrodos ou aparelhos implantados sendo desalojados pelo animal ou seus companheiros de gaiola, resultando em hemorragia, trauma no tecido, contaminação da cavidade abdominal por conteúdo gastrointestinal ou secreções, septicemia e, possivelmente, morte devido a um choque hemorrágico ou séptico;
- vazamento de conteúdo gastrointestinal, secreções pancreáticas ou bile na cavidade abdominal causando peritonite;
- falha de cateteres vasculares devido à trombose ou infecção;
- danos em órgãos como o rim devido a infarto por trombos liberados a partir do implante;
- bloqueio ou infecção de cateteres biliar ou pancreático, os quais, devido à natureza das secreções, resultam em colecistite e insuficiência hepática ou pancreatite aguda;
- tamanho, peso ou local de implante dos cateteres e aparelhos que impactam nas atividades normais de um animal e, quando implantados nas cavidades do corpo, impactam na função dos órgãos vitais.

Isolamento social pode ser necessário durante a recuperação da anestesia para prevenir agressão de outros membros de um grupo social. Entretanto, em alguns casos, o isolamento contínuo pode ser necessário, para prevenir danos ao local da incisão/cateter/instrumentos cirúrgicos ou implantes. Nestes casos, recomenda-se alojar o animal em gaiola que lhe permita o contato visual, auditivo e olfatório deve ser mantido.

Após um procedimento cirúrgico, o padrão de comportamento que indica que um animal está sentindo dor é variável dependendo da espécie e do grau de invasividade do procedimento cirúrgico. O risco potencial ao bem-estar do animal originado por procedimento cirúrgico pode ser reduzido, quando certos cuidados são tomados no pré, trans e pós-cirúrgico, tais como:

- desenvolvimento e revisão de planos de controle da dor, incluindo analgesia preventiva ou protetiva;

ANEXO I

- seleção de agentes anestésicos e analgésicos apropriados para a espécie e o procedimento;
- monitoração da profundidade da anestesia e o controle dos efeitos adversos da anestesia;
- uso de procedimentos assépticos em todos os procedimentos de recuperação;
- competência dos envolvidos em todos os aspectos do processo, especialmente na administração e monitoração do anestésico e analgésico e desempenho dos procedimentos cirúrgicos.

Equipe técnica

Cirurgias frequentemente envolvem a utilização de técnicas novas ou a adaptação de métodos cirúrgicos que são utilizados em outras espécies. Nestas circunstâncias, quando o cirurgião não estiver familiarizado com o procedimento em uma espécie específica, com sua abordagem anatômica, com a viabilidade do procedimento novo ou recentemente proposto, para minimizar complicações cirúrgicas e para desenvolver e revisar estratégias de administração do pós-operatório, os seguintes passos são propostos:

- desenvolver procedimentos desfechos todas às vezes que a dor ou o desconforto for detectado nos animais em estudo, com a finalidade de evitar sofrimento desnecessário;
- realizar um estudo da anatomia topográfica, utilizando amostras de cadáver para se familiarizar com os planos e acidentes anatômicos, para avaliar a viabilidade do procedimento proposto e abordagem cirúrgica ideal e para identificar riscos cirúrgicos;
- realizar a intervenção cirúrgica como um procedimento prévio, de não recuperação em um número suficiente de animais para ter confiança para lidar com o animal ao longo do período de recuperação; este passo também permitirá uma avaliação da técnica anestésica e terapias de apoio que melhor manterão a estabilidade fisiológica durante os procedimentos cirúrgicos;
- desenvolver um plano de gerenciamento do pós-operatório baseado nas consequências e riscos previstos;
- conduzir um estudo piloto que permita a recuperação de um número limitado de animais;
- analisar e rever os procedimentos cirúrgicos e anestésicos e planos de gerenciamento pós-operatório e da dor;

Realizar um curso e trabalhar com um mentor experiente é recomendado para pessoas que precisam adquirir habilidades em técnicas cirúrgicas básicas. Modelos de simulação podem ser utilizados para praticar técnicas de sutura e colocação de cateteres.

Ações que reduzem ou minimizam a magnitude e duração de perturbações metabólicas associadas ao estresse cirúrgico e complicações no pós-operatório auxiliam nos objetivos de qualidade de vida animal e na promoção dos princípios de Refinamento e Redução. Um resumo de estratégias para minimizar os riscos ao animal está listado na Tabela 8.

A complexidade e extensão das questões envolvidas em procedimentos cirúrgicos requerem avaliação cuidadosa para identificar riscos, desenvolver estratégias para minimizar ou gerenciar esses riscos e desenvolver um plano eficaz de controle da dor. Um estudo piloto pode ser necessário para informar este processo. O planejamento também deve incluir uma avaliação da disponibilidade e adequação de instalações e equipamentos, bem como das habilidades, conhecimento e experiência das pessoas envolvidas. Uma vez que um plano de gerenciamento foi formulado, uma análise contínua irá identificar oportunidades para refinar métodos e procedimentos.

Toxicologia

Toxicologia, segundo um consenso estabelecido entre as sociedades mundiais que atuam nessa área, é o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos, físicos ou biológicos sobre organismos vivos e no ecossistema, incluindo a prevenção e ou minimização desses efeitos.

Testes toxicológicos

Testes toxicológicos podem identificar potenciais efeitos adversos à saúde ou demonstrar a segurança de novas substâncias químicas e novos produtos, fornecendo assim a base para a salvaguarda da saúde humana e animal. Estes testes são importantes para a análise de risco. Testes ecotoxicológicos podem ser exigidos pela legislação para caracterizar perigos e para avaliação de risco ambiental tanto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), quanto por ministérios responsáveis pelo registro de novas moléculas para variados fins.

Autoridades reguladoras nacionais e internacionais necessitam equilibrar as preocupações entre o bem-estar animal e a necessidade de obter informações toxicológicas. A toxicologia é um campo cada vez mais harmonizado internacionalmente e considera uma vasta gama de organizações preocupadas com o desenvolvimento e validação de testes alternativos.

Para que os estudos de segurança e risco de novos produtos para utilização nos animal, e aí inclui-se o próprio homem, e em relação ao impacto no meio ambiente sejam considerados por agencias regulatórias, é necessária uma observância total às recomendações dos guias (guidelines) internacionalmente aceitos. Com relação aos estudos científicos, recomenda-se que esses mesmos guias sejam seguidos, sempre que possível, pois neles são considerados os aspectos éticos, e a aplicação dos 3Rs (Substituição, Redução e Refinamento das técnicas).

Metodologias adotadas para avaliação de risco.

Estão disponíveis para estudos toxicológicos, vários protocolos internacionalmente aceitos, e alguns exemplos estão listados a seguir:

- toxicidade aguda: Estudo da toxicidade produzida por uma substância teste quando administrada uma ou mais vezes em um período que não exceda 24 horas.
- toxicidade subaguda: Estudo da toxicidade produzida por uma substância teste quando administrada diariamente durante período não superior a um mês, os protocolos internacionais usualmente abrangem período que pode variar entre 14 ou 28 dias.
- toxicidade subcrônica: Estudo da toxicidade em que a substância teste é administrada diariamente por pelo menos 90 dias.
- toxicidade crônica: Estudo da toxicidade em que a substância teste é administrada diariamente por pelo menos 6 meses, com exigências variáveis para diferentes espécies e para as diferentes necessidades investigativas.
- irritação: Avaliação de risco irritativo para substâncias, nos olhos, pele e mucosas. Para esse tipo de avaliação já existem métodos alternativos validados internacionalmente, e se recomenda o uso desses sempre que possível.

ANEXO I

- **carcinogenicidade:** Avaliação do potencial de uma substância para causar câncer. Esses estudos são de longa duração, prolongando-se por quase toda a vida do animal (roedores) e diante dessa situação, recomenda-se que sejam desenvolvidos somente em instalações ou laboratórios de utilização com condições sanitárias e estruturais capazes de manter a vida desses animais por longos períodos sem interferências, a não ser aquelas previstas no proposta do estudo aprovada por Comissão de Ética.
- **teratologia:** Estudos que visam a determinação do potencial de uma substância para causar desenvolvimento pré-natal anormal, a produção de anomalias congênitas.
- **reprodução:** Estudos que visam a determinação do potencial de uma substância para causar desenvolvimento anormal no período perinatal, incluindo-se os estudos de uma ou duas gerações sequenciais. Sempre que possível deve-se optar pelos protocolos de uma geração com extensão de observações, no intuito de diminuir o número de animais incluídos nos estudos.
- **genotoxicidade:** Estudos que avaliam a habilidade de uma substância para induzir alterações no material genético (DNA, nucleotídeos, cromossomos).
- **estudos ecotoxicológicos:** avaliam o risco e a segurança de substâncias para o ecossistema.

Questões essenciais referentes ao bem-estar animal a serem consideradas.

As considerações essenciais ao bem-estar animal para condução de estudos de avaliação de risco e segurança são:

- avaliar a possibilidade de utilização de métodos alternativos a utilização de animais.
- minimizar a utilização de animais lançando mão delineamento estatisticamente projetado, protocolos internacionalmente aceitos e validados ainda que se trate de estudos acadêmicos – considerar protocolos descritos em guias que contemplem as exigências regulatórias em parte ou em sua totalidade.
- minimizar a dor e a perturbação quando essas condições forem essenciais ao estudo.

Métodos alternativos

Há um amplo escopo para a aplicação do Princípio dos 3R's na utilização de animais em estudos toxicológicos. Cada vez mais, alternativas validadas a animais sencientes são utilizadas em testes de toxicidade e nesse sentido, a validação de um método é definida como um processo pelo qual a confiabilidade e relevância de um procedimento são estabelecidas para um fim específico. Todavia, nas situações em que a finalidade é regulatória, deverão ser usados os delineamentos propostos nas diretrizes internacionalmente aceitas para esse fim, uma vez que só estão disponibilizados aqueles que se consideram validados.

Projetos de estudo para atender às necessidades regulatórias

No sentido de evitar a utilização desnecessária de animais, é essencial observar as exigências regulatórias especificadas pelas autoridades nacionais e internacionais e que estão descritas nos guias. Essas incluem os tipos de teste, espécies-alvo, via de administração e parâmetros estatísticos de forma a se obter o máximo de informações com o mínimo de envolvimento animal e resultados aplicáveis e seguros.

O racional para estudos que visam a determinação de risco e segurança de novas moléculas inclui o seguinte: Estudos de genotoxicidade, estudo da toxicidade aguda em substituição ao cálculo da DL₅₀ que foi abandonado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) em 2001; estudos de toxicidade em doses repetidas (duas espécies, uma roedora e uma não roedora); estudos de toxicidade para a produção e para novos fármacos; adicionalmente estudos de segurança farmacológica específicos. Os protocolos para conhecimento do potencial irritativo ou corrosivo para olhos, pele e mucosas devem ter sua aplicabilidade avaliada caso a caso, uma vez que se o dano é presumido, tornam-se desnecessários para substâncias ou formulações nas quais propriedades químicas ou físicas sugerem que essa forma de toxicidade é provável, por exemplo, pH acima de 11,5 ou abaixo de 2.

Ainda no sentido de minimizar e racionalizar a utilização de animais para estudos de toxicologia, o planejamento deve incluir a busca de informações relacionadas à molécula (pKa, pH, estrutura química, caracterização físico-química etc), parâmetros que podem ser base para cálculos que facilitem estabelecer concentrações para teste e a indicação de vias de administração ou de exposição, eliminando a possibilidade de procedimentos desnecessários.

Minimizar a dor e a perturbação

Quando alternativas não estão disponíveis, não estão previstas nos guias, ou não são permitidas pelos órgãos de registro, há um forte indicativo para que os estudos de toxicidade conduzidos em animais sejam acompanhados de observação de sinais clínicos que indiquem dor e perturbação. No entanto, deve-se ter em mente que a toxicologia não visa exclusivamente a determinação do risco, mas primordialmente a determinação clara da segurança. Dentro dos limites da legislação, a minimização de dor e perturbação deve ser um requisito primordial. Regulamentações de testes de toxicidade normalmente permitem somente o tratamento de dor e perturbação em animais se as providências para minimizar essas situações não apresentarem interferência direta com o estudo. Assim, os animais nesses estudos são raramente tratados com analgésicos ou outras providências, tendo em vista a probabilidade de mascarar resultados. Nesse sentido, é essencial que os protocolos propostos tenham desfechos claramente definidos descrevendo quando os animais devem ser removidos do estudo por razões humanitárias, e devem incluir previamente os critérios descritos para determinar quando os animais podem ser removidos, tratados ou receber eutanásia. A morte como desfecho deve ser evitada em todas as circunstâncias a não ser que seja uma exigência legislativa obrigatória. A identificação e desenvolvimento de biomarcadores detectáveis podem servir como desfecho antecipado. Esses devem ser conectados ao mecanismo ou modo de ação de toxinas e podem ser clínicos, patológicos, fisiológicos ou comportamentais. Esses biomarcadores podem ser observáveis, como comportamento, ou mensuráveis, como a

temperatura do corpo e pressão sanguínea, ou dados resultantes de análises bioquímicas. Avanços em telemetria não invasiva permitem que ECG e dados de pressão arterial sejam registrados com mínimo de impacto no animal. Alguns autores consideram que, a marcha da pesquisa toxicológica deve considerar os desfechos humanitários baseados em procedimentos que causem quantidade mínima de dor e perturbação aos animais e que detectem e monitorem sinais precoces de dor e desconforto. Biomarcadores urinários poderiam fornecer indicadores precoces e sensíveis de desconforto devendo-se considerar que a coleta de urina pode ser não invasiva. O monitoramento do estado do animal no transcorrer do estudo deve ser feito de forma responsável e incluir, além do exame clínico diário, a observação constante bem como o amparo de análises clínicas por profissional capacitado que, em conjunto, poderão determinar o ponto final da participação de cada um dos animais na investigação. É aconselhável para esses casos o acompanhamento de um médico veterinário. Adicionalmente, a implementação de um estudo piloto pode ajudar a prever quais critérios serão utilizados para determinar o momento da exclusão do animal por eutanásia, evitando-se sofrimento desnecessário.

Procedimentos para modificação no comportamento animal

Em alguns projetos de pesquisa, o comportamento animal é modificado ou manipulado para obter um resultado científico. Isso pode envolver tratamentos como o uso de recompensas, ou estressores biológicos, incluindo imobilização física, privação social, administração de drogas, restrição de comida ou água, ou exposição a estímulos que causam dor ou distresse.

O comportamento de animais é modificado ou manipulado em muitos campos de pesquisa científica, incluindo psicologia, ciência do comportamento animal (etologia), pesquisa fármaco-comportamental e pesquisa da dor, pesquisa genética e neurociência.

Estratégias para modificar o comportamento:

- a) Esquiva: o animal recebe opções e pode tomar uma decisão quanto a seu comportamento baseado em preferência.
- b) Manipulação de variáveis sociais: incluindo densidade populacional, experiência social prévia, introdução de novos animais “intrusos” em um grupo estabelecido, separação social, isolamento ou perda.
- c) Recompensa: uma recompensa (reforço positivo) pode ser oferecida quando o animal completa com sucesso uma tarefa que foi treinado a fazer. Em alguns casos, a recompensa é um “agrado” como um alimento ou bebida altamente saborosos. Em outros casos, o acesso do animal à comida e água é limitado antes de uma sessão de treino e o animal recebe alimento e água adicionais como recompensa.
- d) Punição: os estímulos que são considerados aversivos podem variar entre espécies e podem incluir gaiolas novas ou não familiares, sabores desagradáveis, presença de um predador, um animal ou grupo social estranho, extremos de luz, temperatura ou som, um

sopro de ar frontal, ou outros estímulos aversivos. Os animais responderão escapando ou evitando os estímulos.

No item “c” pode ser utilizado alimento sólido ou líquido como recompensa, mesmo em animais bem alimentados (saciados). A restrição de comida ou água é normalmente alcançada limitando-se a quantidade diária disponível para o animal ou limitando o período diário de acesso. Se a restrição for prolongada, poderá ocorrer desidratação ou perda de peso corporal. O impacto da restrição de alimento ou água é descrito no item Modificação no consumo de alimento e água. Privação considerável de água ou alimento deve ser evitada.

As respostas básicas comportamentais e fisiológicas (medo e estresse) são minimizadas se o animal for capaz de controlar os estímulos aversivos. Situações nas quais os animais não podem influenciar ou controlar a experiência aversiva são especialmente perturbadoras para eles. Respostas comportamentais de medo e estresse incluem:

- escape: interromper contato com um estímulo aversivo;
- recusa: um comportamento assimilado que previne uma experiência aversiva;
- diminuição da higiene, consumo de alimento, nível de atividade, exploração, atividade sexual, comportamento materno e perda de peso corporal
- aumento do comportamento de “congelamento”.

Esses comportamentos de resposta são típicos da espécie, mas os estímulos aversivos que os evocam são assimilados. Estímulos sensoriais aversivos ou negativos não podem ser utilizados, e estímulos de dor ou enjoo devem ser evitados. Caso seu uso seja necessário, o nível e duração dos estímulos devem ser minimizados, e o escape do estímulo deve estar disponível.

Agrupamentos sociais apresentam efeitos comportamentais e fisiológicos potencialmente benéficos e também adversos na maior parte das espécies de animais de laboratório:

- Os efeitos positivos do agrupamento social incluem higiene e cuidados maternos e paternos, afeição social (desenvolvimento de vínculos) e influencia no desenvolvimento de filhotes. Estimular o cérebro com informações sensoriais afeta o crescimento e a interconectividade do cérebro, afetando assim a função. O enriquecimento dos estímulos do ambiente possui efeitos permanentes nos cérebros de ratos, e esse efeito pode ocorrer até em animais idosos. A privação social pode resultar em prejuízo ao crescimento.

- Os efeitos negativos incluem agressividade, brigas e alterações imunológicas e cardiovasculares, além de depressão induzida por estresse social. Em muitos casos, os efeitos negativos em animais subordinados nos casos de hierarquias de dominância social somem com o tempo. Entretanto, se comida ou água for restringida, os animais subordinados podem continuar a ser afetados adversamente.

Em algumas situações o protocolo de pesquisa requer alojamento individual, como por exemplo:

ANEXO I

- consumo individual de alimento e água do animal deve ser registrado;
- efeitos farmacológicos sobre o comportamento de um indivíduo pode reduzir sua habilidade de se alimentar, ou induzi-lo a ser atacado por companheiros de gaiola.
- instrumentos de modificação de comportamento e de registro são anexados à gaiola, e respostas individuais dos animais são necessárias.

Privação social ou interações sociais negativas não podem ser utilizadas. Quando espécies sociais necessitam permanecer fisicamente isoladas, o contato visual, auditivo e olfatório deve ser mantido.

e) Déficit neurológico: criação de anormalidades na estrutura ou função do sistema nervoso. Por exemplo, por alterações genéticas, por uso de substâncias químicas tóxicas ao sistema nervoso, ou por danos físicos em áreas específicas do cérebro, medula espinhal ou nervos. Essas anormalidades assemelham-se às doenças neurológicas que ocorrem em humanos naturalmente e que envolvem disfunção comportamental ou sensorial. Exemplos incluem modelos quimicamente induzidos da Doença de Parkinson; dano físico em vasos sanguíneos para causar acidente vascular cerebral; e linhagens de camundongos com uma alta predisposição genética a epilepsia ou convulsões.

Dependendo do local e gravidade da patologia, após o déficit neurológico ser induzido, atenção especial deve ser dada aos animais. O déficit pode diminuir a habilidade de cuidar de si mesmo. Sua posição na hierarquia social provavelmente será baixo uma vez que o déficit for criado, e isso poderá resultar em conflitos e habilidade reduzida de obter alimento quando alojados com o grupo. Em algumas situações, eles necessitam ser alojados em isolamento físico. Primatas não humanos alojados em pares podem ser cuidados, em parte, por seu companheiro de gaiola.

f) Drogas: alterações na função do sistema nervoso através do uso de substâncias químicas. Por exemplo, drogas analgésicas alteram a percepção de dor do animal, e retardarão ou eliminarão a resposta comportamental ao estímulo de dor.

g) Aparato: equipamentos que contêm o animal, apresentam estímulos ou registram respostas comportamentais.

Aparato inclui:

- instrumentos de imobilização (gaiola metabólica, imobilizador de cabeça);
- câmaras de registro (incluindo monitor de atividades, plataforma de telemetria);
- aparato especial (ex.: área de campo aberto, labirinto, roda giratória, tambor rotativo, câmara operante/"caixa de Skinner");

ANEXO I

- aparato de memória e aprendizado espacial utilizado com roedores (ex.: labirintos como braço radial, plataforma circular de Barnes, labirinto aquático de Morris).

h) Estudos de neurociência de comportamento acordado: incluem estudos das funções mais “elevadas” do cérebro, como a percepção, memória e controle motor, que envolvem a participação ativa do animal. Esses estudos requerem um estágio preliminar extensivo, durante o qual o animal é treinado para realizar uma tarefa e tem implantado, cirurgicamente, os instrumentos de coleta de dados ou de monitoramento. Os dados são coletados diariamente por um período que pode se estender por anos.

Cuidados a serem considerados para a modificação do comportamento:

Sinais gerais de dor ou desconforto devem ser monitorados, constantemente. Atenção especial é requerida aos protocolos de restrição de fluídos que podem resultar em perda rápida de mais de 15% do peso do corpo, sede, secura das membranas mucosas, quantidade reduzida de urina, consumo reduzido de alimento, perda de elasticidade da pele, olhos fundos, tremor, letargia e choque ou colapso cardiovascular.

Em todos os casos nos quais a pesquisa pode ter impacto sobre o consumo de alimento ou água de um animal, uma justificativa científica circunstanciada deve ser fornecida à Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) ao buscar aprovação.

Animais com aparência descuidada ou suja, produção reduzida ou ausente de urina ou fezes, postura anormal, fraqueza ou perda de função generalizada ou localizada, ou movimentos gerais reduzidos devem ser monitorados cuidadosamente.

Aumento de mordidas, de escape e de comportamento de congelamento; produção de lágrimas, incluindo lágrimas vermelhas ou porfíria; ranger de dentes; vocalização aumentada; movimento exacerbado ou reduzido; autoisolamento, agressividade exacerbada ou reduzida; respiração rápida, de boca aberta ou exagerada; alteração de hierarquias sociais, também devem ser monitorados;

Todos os passos devem ser tomados para garantir que a dor e o desconforto sejam minimizados. Portanto, a pesquisa envolvendo modificações de comportamento deve ser justificada cientificamente, aprovada pela respectiva comissão de ética para o uso de animais e conduzida de forma a minimizar qualquer efeito adverso para os animais. A Tabela 6 resume procedimentos gerais e considerações para minimizar os efeitos adversos da modificação de comportamento.

Indução de tumor

Tumores podem ser induzidos em animais de laboratório por meio de transplante de células tumorais específicas (frequentemente de origem humana), exposição a substâncias cancerígenas ou infecção com vírus indutores de tumor. Com o advento das técnicas de manipulação genética, linhagens de animais podem ser estabelecidas para desenvolver tumores espontâneos específicos.

Por meio da indução de tumores pode-se investigar sua biologia e avaliar a eficácia de vários tratamentos para inibir ou reverter o crescimento de tumor e o desenvolvimento metastático. O nível e frequência de tratamentos dependerão dos agentes de interesse. Os animais podem ser submetidos a uma única ou múltiplas exposições e mantidos em isolamento sob barreiras sanitárias.

O procedimento utilizado com maior frequência envolve o enxerto de células tumorais no animal hospedeiro por transplante de células ortotopicamente, isto é, no tecido ou órgão de origem, ou ectopicamente, geralmente no espaço subcutâneo no flanco. O transplante envolverá um procedimento cirúrgico, exceto nos casos em que as células tumorais forem transmitidas via intravenosa ou implantadas subcutaneamente.

A fim de aumentar a absorção do enxerto, o estado imunológico do hospedeiro pode ser modulado por irradiação no corpo inteiro ou pelo uso de agentes imunossupressores. Podem ser utilizados animais imunologicamente comprometidos, tais como camundongos nude (atímicos), camundongos SCID (imunodeficiência grave combinada) e camundongos RAG (sem células B e T). Uma combinação dessas estratégias pode ser empregada.

O estudo de tumores estabelecidos pode envolver a administração de biomarcadores ou moduladores metabólicos para estudar a regulação de desenvolvimento e migração de células, colheita de células tumorais em vários estágios de desenvolvimento para uma análise *in vitro* mais aprofundada ou a variação de vários regimes terapêuticos.

Existe uma tendência a utilização de modelos ortotópicos que facilita o estudo de interações entre as células tumorais e tecidos hospedeiros. Estes tipos de estudo são relevantes principalmente para compreender o crescimento do tumor, o desenvolvimento de metástase e a eficácia de estratégias terapêuticas que são específicas ao tecido hospedeiro. Da mesma forma, animais transgênicos e nocautes são modelos de eventos celulares e moleculares mais precisos e são cada vez mais utilizados em estudos de câncer.

Considerações de bem-estar animal

O grande impacto no bem-estar dos animais em estudos indutores de tumor está associado ao desenvolvimento e biologia do tumor, aos efeitos colaterais de agentes terapêuticos, às consequências da cirurgia e aos efeitos colaterais de tratamentos imunomoduladores, como a irradiação. Efeitos adversos, em especial o tamanho do tumor, dor e subnutrição, irão variar com o tipo de tumor. Dependendo do local de implante, o crescimento do tumor pode afetar a mobilidade de um animal ou, especialmente em transplantes ortotópicos, resultar em sérias complicações fisiológicas. Somamos a isso, o desenvolvimento e disseminação de metástases em órgãos como o fígado ou pulmões.

Estudos neuroquímicos recentes indicam que os tumores são associados ao estado de dor persistente diferente da dor inflamatória ou neuropática. Entretanto, foi sugerido que os níveis de dor são significativamente menores com enxertos ectópicos do que com enxertos ortotópicos. Neste último caso, os animais estão propensos a sentir a dor de forma similar aos humanos.

ANEXO I

A caquexia, um estado de subnutrição grave, é concomitante ao desenvolvimento do tumor. Embora haja certa diminuição no consumo de alimento, alterações metabólicas significativas são a razão primária para a perda de peso, perda de massa muscular, anemia e anorexia, a gravidade desses efeitos varia com diferentes modelos animais. Outros fatores da perda de peso incluem os efeitos da radioterapia, nos casos em que o trato gastrointestinal for danificado durante o tratamento o efeito atenuador do tumor na resposta metabólica à cirurgia com alterações na permeabilidade do intestino; e consumo reduzido de alimento associado aos efeitos colaterais de agentes quimioterápicos.

Complicações potenciais do procedimento cirúrgico podem afetar o desenvolvimento do tumor e ter implicações tanto para a interpretação de dados como para o impacto do procedimento no bem-estar do animal. A hipotermia, uma complicação cirúrgica comum, suprime a função imunológica e resistência do hospedeiro a metástases tumorais. A escolha de agente anestésico pode afetar o enxerto do tumor e a administração da dor no pós-operatório pode afetar o desenvolvimento do tumor.

Os efeitos colaterais específicos dos agentes quimioterápicos também necessitam ser levados em consideração. Eles podem incluir os efeitos imediatos de náusea ou perda de apetite e efeitos a mais longo prazo, incluindo a perda de peso e alterações patológicas como comprometimento das funções hepáticas e renais.

Monitoramento da dor e distresse

As diretrizes do Comitê de Coordenação da Pesquisa do Câncer do Reino Unido fornecem uma discussão ampla de como o bem-estar do animal deve ser monitorado em animais que foram submetidos à indução de tumores e, em especial, a implementação de desfechos humanizados nas estratégias de monitoramento.

A interpretação das alterações no peso corporal de um animal deve ser feito cuidadosamente, pois este dado sozinho pode não ser um indicador confiável. Com o crescimento do tumor, o peso do tecido do tumor aumenta e, às vezes, o líquido fica acumulado nos tecidos corporais (edema) e cavidades do corpo (ex.: ascite no abdômen). Isso pode mascarar perdas significativas de peso corporal e a interpretação de tais alterações deve ser feita de forma crítica, levando em consideração outros fatores como a condição do corpo e comportamento.

É evidente o valor de novas técnicas de imagem como a bioluminescência, ultrassom com agente de contraste aumentado, tomografia computadorizada volumétrica e microscopia de vídeo para monitorar o crescimento do tumor e disseminação da metástase. Entretanto, as imagens devem ser associadas com dados específicos da função do órgão para avaliação das alterações e estabelecimento de desfechos.

Minimização da dor e distresse

O protocolo escolhido deve ser compatível com os objetivos do estudo e ter mínimo risco para o animal. Deve ser realizado um estudo piloto nos casos em que o protocolo não ficar consistente.

O planejamento de estudos de procedimentos indutores de tumor em animais deve considerar o local de implante ou método de indução do tumor, a biologia do tumor, o potencial para lesões, desenvolvimento de metástases, produção de fatores caquéticos, estabelecimento do desfecho mais antecipado possível, efeitos tóxicos separados da terapia anticâncer e estabelecimento dos desfechos compatíveis com uma avaliação confiável da eficácia da terapia em estudos iniciais.

As estratégias para minimizar o impacto de um determinado protocolo necessitarão ser desenvolvidas especificamente no contexto de cada estudo, levando em consideração o impacto de cada um dos fatores citados.

Um elemento essencial no planejamento de estudos é o estabelecimento de desfechos humanizados e existe uma vasta discussão de como desenvolver esses desfechos.

O desenvolvimento de técnicas de imagem que permitem o monitoramento *in vivo* do crescimento do tumor e metástase é um avanço importante para o refinamento e controle do impacto do desenvolvimento do tumor e para o estabelecimento de desfechos precisos em termos de crescimento, metástases e eficácia de intervenções terapêuticas.

Os efeitos de caquexia são difíceis de administrar, mas é importante garantir que os animais recebam uma dieta nutricionalmente adequada. Também é importante reduzir os efeitos de outras causas de perda de peso, como o uso profilático de líquidos parenterais em casos de radioterapia.

Outros aspectos a serem considerados incluem o delineamento estatístico para garantir a utilização mínima de animais, o cuidado animal, o alojamento de animais, o estresse social decorrente dos efeitos de isolamento na função imunológica e crescimento do tumor e o potencial para essas influências de perturbar a interpretação da eficácia da quimioterapia.

Produção de anticorpos policlonais

Os anticorpos são imunoglobulinas séricas com especificidade de ligação para antígenos específicos.

Embora os anticorpos possam ser identificados no soro de indivíduos e animais doentes que tenham sido expostos a determinados agentes patogênicos, os métodos usuais para eliciar anticorpos envolvem a imunização com preparações de antígenos purificados ou parcialmente purificados. Os antígenos mais frequentemente utilizados são proteínas ou peptídeos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, pequenas moléculas orgânicas (haptens) conjugados com proteína carreadora, células, extratos de células e também tecidos.

A primeira consideração a fazer, em geral, é distinguir entre anticorpos policlonais ou monoclonais. Os anticorpos policlonais são particularmente valiosos para imunoprecipitação e imunotransferência (soro terapêuticos), enquanto que os anticorpos monoclonais podem ter excelentes especificidades e pode ser aplicado para quase qualquer finalidade.

A escolha da espécie animal a ser utilizada para a imunização é baseada, em parte, na capacidade de gerar anticorpos de grande especificidade para antígenos geneticamente

definidos que podem necessitar de uma produção em larga escala com desejável reatividade cruzada.

A quantidade de anticorpo necessária também deve ser avaliada. Os clones de hibridomas (somática híbridos de células B de baço e de mieloma de tumores de um animal imunizado são permissivas para a produção de imunoglobulinas monoclonais) fornecer uma quantidade bastante limitada e essencialmente tem reatividade para apenas um epítipo. No entanto, o investimento inicial na produção de um anticorpo monoclonal é grande, ao passo que quantidades relativamente abundante de um antissoro policlonal pode ser obtidas a partir de um único coelho ou a partir de vários camundongos ou ratos geneticamente idênticos ou ainda cavalos.

A seguir descreveremos a produção de antissoros policlonais por imunização com antigênio emulsionado em adjuvante. O método descrito é aplicável a coelhos, a camundongos, a ratos e a hamsters, e também pode ser utilizado em animais maiores, tais como carneiros ou cabras e cavalos.

É importante salientar que as emulsões de Freud completo e incompleto não são mais permitidas para obtenção de antissoros policlonais, pois a sua composição a base de lanolina e parafina, bem como, na chamada formulação completa, é acrescida de células de *Micobacterium bovis* inativado pelo calor. Todas essas substâncias são extremamente inflamatórias e levam a reações doloridas levando ao sofrimento do animal. Pode se usar emulsões com base de óleos brancos de qualidade farmacêutica (ex: Marcol® - Exxon) e substâncias surfactantes de aplicação farmacêutica (Span 80®, tween 80®), ou ainda óleos biodegradáveis como o esqualeno.

Os protocolos detalhados para a produção de anticorpos monoclonais são fornecidos a seguir. Com pequenas modificações, os protocolos podem ser aplicáveis a camundongos, ratos e hamsters.

Uma boa produção de antissoros depende, em grande parte, da qualidade, pureza e quantidade de antígeno disponível, bem como sobre a especificidade e sensibilidade do ensaio. Para antígenos de proteínas, se possível, o material deve ser homogêneo e bioquimicamente, dependendo da utilização pretendida, pode estar em uma conformação nativa ou desnaturada.

Deve-se estar ciente de que os contaminantes são frequentemente presentes (infelizmente), porém em menores quantidades de antígenos que o imunógeno de interesse, e a partir da imunização o antissoros resultantes podem ter mais atividade contra os contaminantes do que contra a proteína de interesse.

O antissoro a ser utilizado para o rastreio de bibliotecas de expressão de cDNA de bactérias ou por imunomarcas são melhor realizadas contra a proteína desnaturada, enquanto que os que se utilizam para o rastreio de cDNA expressos em sistemas de transfecção eucarióticas ou para imunoprecipitação de estruturas de células nativas sintetizado pode ser feita melhor contra a proteína nativa.

ANEXO I

Embora os avanços oferecidos pelo desenvolvimento de técnicas de anticorpos monoclonais têm revolucionado a especificidade, a uniformidade, e a quantidade de anticorpos existem muitas circunstâncias em que os anticorpos policlonais são mais desejáveis do que os anticorpos monoclonais. Produção de antissoros policlonais leva menos tempo e esforço do que a produção de anticorpos monoclonais exige um equipamento relativamente simples e prontamente disponível, e produz reagentes que podem ser utilizados para imunoprecipitação, imunotransferência, e ensaio imunoenzimático (ELISA).

A escolha do animal para a produção de anticorpos depende da quantidade desejada de antissoro, da distância evolutiva entre as espécies a partir do qual a proteína de interesse foi derivada e da espécie do animal a ser imunizado, e experiência prévia com os imunógenos. Os coelhos são os animais de escolha, porque eles são geneticamente distintos das fontes de proteínas humanas e de camundongos os quais possuem as proteínas mais estudadas. Coelhos podem fornecer até 25 ml de soro, sem efeitos prejudiciais significativos aos animais.

Quando for utilizada pequena quantidade de antissoro, ou para aqueles que dependem de anticorpos com especificidades precisamente definidas, linhagens puras de animais pode ser o sistema de escolha. Porque camundongos são menores, o volume de suspensão de antígeno utilizado para a imunização é significativamente menor e a quantidade de soro que pode ser obtido a partir de uma única punção não é superior a 0,5 ml. Os ratos e hamsters podem ser usados quando for necessárias quantidades de soro maior, ou quando a maior distância evolutiva é vantajosa. Com punção repetida, pode ser obtido até 5 ml de soro a partir destas espécies.

Na presença de adjuvante (emulsões ou hidróxido de alumínio), o antígeno a base de proteína é aplicado por via intramuscular, intradérmica, subcutânea na espécie escolhida de animal. Imunizações de reforço são iniciadas 4 a 8 semanas após a imunização primária e continua em intervalos de 2 a 3 semanas. Antes da primeira imunização e de cada imunização de reforço, é obtido o sangue do animal e o soro preparado a partir de sangue total.

Materiais

Coelho, camundongo, rato ou hamster

Adjuvante (ISA 52® - Seppic®, Hidróxido de Alumínio)

1 a 2 mg/mL de antígeno de proteico em tampão salina-fosfatada (PBS) purificado

Tubos de 50 ml para centrifuga de polipropileno descartáveis

Seringas descartáveis de 3 ml

Conector hub com bloqueio duplo-end (Luer-Lok, Becton Dickinson) ou torneira plástica de 3 vias para conexão para seringa.

Reagentes adicionais e equipamentos para a contenção do animal, material para injeção parenteral e coleta de sangue.

Produção de Anticorpos Policlonais em Coelhos com adjuvante oleoso (emulsão)

ANEXO I

1. Obter de 0,5 a 2,0 mg de antígeno em 1,0 mL de PBS
2. Misturar com 1,0 mL de adjuvante oleoso (ex: ISA-52)
3. Emulsificar com duas seringas de 5,0 mL conectados com hub duplo-end ou com torneira plástica de (três) vias.
4. Após 5 minutos colocar 1 (uma) gota da emulsão em uma superfície de água, caso a emulsão se disperse a emulsificação deverá continuar por mais cinco minutos, até que o a emulsão na superfície da água não se disperse
5. O antígeno emulsificado poderá ser inoculado até 0,5 mL da seguinte forma:
 - a. No músculo semitendíneo ou músculo glacíl
 - b. Subcutâneo em até 100µL em 10 pontos no dorso (total de 1,0 mL)
6. Após 21 dias repetir a imunização sem adjuvante
7. Após 28 dias da primeira imunização repetir a imunização sem adjuvante
8. Após 35 dias da primeira imunização obter uma pequena fração de soro determinar o título de anticorpos
9. Se o título de anticorpo não for suficiente imunizar após 36 dias da primeira imunização
10. Repetir o item 8 após 45 dias da primeira imunização

Produção de Anticorpos Policlonais em Coelhos com hidróxido de alumínio

Observação – O hidróxido de alumínio deve ser usado de acordo com a concentração de alumínio que não deve ser superior de 1,25 mg por dose

Existem diversas marcas de hidróxido de alumínio para formulação de antígenos vacinais. As preparações estão muitas vezes na forma de gel de hidróxido de alumínio, o que indica que estão na forma de suspensão, devendo então ter sua concentração conhecida.

1. Separar de 0,3 a 1,5 mg de hidróxido de alumínio estéril (o volume dependerá da concentração do gel)
2. Misturar de 0,5 a 2,0 mg de antígeno proteico em condições assépticas (dependente do volume, quanto maior o volume maior a concentração de antígeno)
3. Manter a temperatura ambiente em constante agitação (o suficiente para não precipitar o gel)
4. Inocular por via intramuscular no máximo 0,25mL ou via subcutânea no máximo 0,1mL
 - a. No músculo semitendíneo ou músculo glacíl
 - b. Subcutâneo em até 100µL em 10 pontos no dorso

ANEXO I

5. Após 21 dias repetir a imunização sem adjuvante
6. Após 28 dias da primeira imunização repetir a imunização sem adjuvante
7. Após 35 dias da primeira imunização obter uma pequena fração de soro determinar o título de anticorpos
8. Se necessário imunizar após 36 dias da primeira imunização
9. Repetir o item 8 após 45 dias da primeira imunização

Produção de Anticorpos Policlonais em camundongo com adjuvante oleoso (emulsão)

11. Obter de 10 a 50µg de antígeno em 1,0 mL de PBS
12. Misturar com 1,0 mL de adjuvante oleoso (ex: ISA-52)
13. Emulsificar com duas seringas de 3,0 mL conectados com hub duplo-end ou com torneira plástica de três vias
14. Após 5 minutos colocar 1 gota da emulsão em uma superfície de água, caso a emulsão se disperse a emulsificação deverá continuar por mais cinco minutos, até que o a emulsão na superfície da água não se disperse
15. O antígeno emulsificado poderá ser inoculado até 0,5 mL da seguinte forma:
 - a. Via intraperitoneal
 - b. Subcutâneo em até 50µL em 2 pontos na base da cauda
16. Após 21 dias repetir a imunização sem adjuvante
17. Após 28 dias da primeira imunização repetir a imunização sem adjuvante
18. Após 35 dias da primeira imunização obter uma pequena fração de soro determinar o título de anticorpos
19. Se necessário imunizar após 36 dias da primeira imunização
20. Repetir o item 8 após 45 dias da primeira imunização

Produção de Anticorpos Policlonais em Camundongos com hidróxido de alumínio

Observação – O hidróxido de alumínio deve ser usado de acordo com a concentração de alumínio que não deve ser superior de 1,25 mg por dose.

Existem diversas marcas de hidróxido de alumínio para formulação de antígenos vacinais. As preparações estão muitas vezes na forma de gel de hidróxido de alumínio, o que indica que estão na forma de suspensão, devendo então ter sua concentração conhecida.

01. Separar de 0,3 a 1,5 mg de hidróxido de alumínio estéril (o volume dependerá da concentração do gel)

ANEXO I

02. Misturar de 10 a 100 μ g de antígeno proteico em condições assépticas (dependente do volume, quanto maior o volume maior a concentração de antígeno)
03. Manter a temperatura ambiente em constante agitação (o suficiente para não precipitar o gel)
04. Inocular por via intraperitoneal no máximo 0,5 mL ou via subcutânea no máximo 0,05 mL na base da cauda
05. Após 21 dias repetir a imunização sem adjuvante
06. Após 28 dias da primeira imunização repetir a imunização sem adjuvante
07. Após 35 dias da primeira imunização obter uma pequena fração de soro determinar o título de anticorpos
08. Se necessário imunizar após 36 dias da primeira imunização
09. Repetir o item 8 após 45 dias da primeira imunização

A produção de anticorpos policlonais em ratos e hamster é similar a produção em camundongos sendo a quantidade de antígeno pode ser de 20 a 200 μ g e o volume máximo a ser inoculado por via intraperitoneal é de 1,0 mL e por via subcutânea de 200 μ L em dois pontos na base da cauda.

Estratégias de enriquecimento ambiental

Os alojamentos dos animais em cativeiro, com frequência, diferem bastante do ambiente natural, que é rico em estímulos. Atualmente, a ciência reconhece estas diferenças e incentiva a modificação destes alojamentos com o objetivo de atender às necessidades específicas de cada espécie, visto que os animais são seres complexos, com comportamento e fisiologia adaptados aos seus ecossistemas.

Enriquecimento ambiental é "qualquer medida que promove a expressão de tipos de comportamento naturais específicos da espécie e uma diminuição, se não o desaparecimento, de tipos de comportamento anormais. Deve ser baseado na promoção de um efeito positivo no bem-estar físico e psicológico do animal".

Cuidados a serem considerados para o enriquecimento ambiental:

- O enriquecimento ambiental deve ser fornecido como parte dos cuidados de rotina dos animais. Devem ser levadas em consideração as necessidades comportamentais específicas da espécie, incluindo a disponibilidade e desenho de espaço que permita livre movimentação e atividade, sono, privacidade e contato com outros da mesma espécie.

- É importante observar que espécies diferentes necessitam de diferentes ambientes sociais e, portanto, de diferentes tipos de enriquecimento ambiental. Também é importante observar que o enriquecimento ambiental deve ser realizado com cautela, pois ele pode causar danos

indesejados aos animais e introduzir variabilidade capaz de interferir nos resultados da pesquisa.

Interação com o homem é importante para o bem-estar dos animais e também pode afetar os resultados. Os animais devem ser adaptados à presença humana em geral e, especificamente, aos técnicos e pesquisadores. Para evitar dor e desconforto, todo o manuseio e imobilização devem ser feitos da forma mais positiva, segura e livre de ameaças e por pessoas treinadas para este fim.

- A mudança para um ambiente enriquecido deve ocorrer com cautela e ser iniciada também no âmbito administrativo, com sua inclusão de orçamento destinado a estas estratégias de promoção do bem-estar.

Sugestões de enriquecimento ambiental para roedores e lagomorfos.

Enriquecimento ambiental para roedores

Social:

- Ratos e camundongos são espécies altamente sociais e se comportam melhor quando alojados em pares ou em grupo. O melhor momento para a formação dos grupos é o momento do desmame.
- Uma grande atenção deve ser dada aos grupos formados por camundongos machos, quanto mais velho for o camundongo, maior a ocorrência de problemas de agressão. Devemos ter como regra que grupos de indivíduos do mesmo sexo devem ser formados antes da puberdade. A organização territorial e social apresenta diferenças entre as linhagens de camundongos, os machos adultos da linhagem *Swiss* demonstram maior intolerância uns com os outros no estabelecimento de territórios e apresentam maior grau de agressividade quando comparados a outras linhagens. Adicionar ou remover um indivíduo pode afetar o bem-estar do grupo inteiro.
- A Cobaia é uma espécie social e deve ser alojada em pares ou pequenos grupos de indivíduos compatíveis sempre que possível. Machos frequentemente brigam quando atingem a maturidade sexual e devem então ser separados.
- Na natureza, o hamster normalmente tem um comportamento solitário e agressivo uns com os outros, marcando seus territórios por meio das glândulas odoríferas em seus flancos. Recomenda-se, quando necessário, alojar hamster em grupos do mesmo sexo, formado durante o desmame.

Relação homem-animal:

- Conduza o manejo diário de forma sistemática e suave e evite procedimentos os quais possam causar estresse.
- Para familiarizar o rato ou camundongo com o técnico, deve-se permitir que o animal explore seu manuseador. Adaptar os animais para acostumar-se a procedimentos que

ANEXO I

necessitem ser repetidos, no momento da retirada da tampa das gaiolas, insira a mão dentro da gaiola e permita a proximidade do animal, permita que ele se acostume a este procedimento.

- O manuseador do animal pode ser uma fonte de enriquecimento social. A implantação de reforço positivo ou agrados após o término da atividade é recomendado para todas as espécies.

Alimento:

- Roedores preferem buscar seu próprio alimento. Quando permitido pela proposta do estudo e resguardados os cuidados com problemas de contaminação, sementes podem ser espalhadas na cama o que, permite a busca pelo alimento. Outra forma de enriquecimento alimentar é espalhar sementes por cima do alimento peletizado, algumas irão cair por entre os espaços, mas a maioria ficará presa entre os pellets.
- Sempre que possível ofereça alimentos alternativos além da ração peletizada, desde que não interfira na proposta em estudo.
- Para cobaias, pode ser oferecido feno dentro da gaiola; folhas verdes podem ser dadas como um suplemento a uma ração balanceada. Esta espécie reluta em comer alimentos desconhecidos e uma mudança rápida na dieta pode causar perturbações digestivas. Portanto, introduza novos alimentos de forma gradativa. Uma vez que os animais estejam acostumados, pode-se ter uma variedade de alimentos oferecidos como agrado em forma de rodízio.
- Mistura de sementes podem ser dispostas no piso da caixa alimentação de hamsters jovens. Entretanto, os animais comerão principalmente sementes de girassol e excluirão outras. Estratégias alimentares poderão ser benéficas para o bem-estar dos animais, no entanto o controle de qualidade de tais sementes é essencial uma vez que existe o potencial de contaminação química ou biológica. Esta prática pode ser contraindicada para animais em estudos nutricionais ou de toxicologia.

Ambiente físico:

- Ratos e camundongos são animais noturnos e buscam esconder-se da luz e buscar abrigo. O fornecimento de tubos de PVC ou outro material resistente propicia abrigo durante o dia. O fornecimento uma folha de papel toalha é uma excelente forma de incentivar o comportamento de nidificação, típico de roedores.
- O aumento do espaço propiciando diferentes níveis dentro da gaiola ou o fornecimento de objetos para os animais escalarem ou se exercitarem também pode ser oferecido. Quando estão se movendo, camundongos preferem ficar em contato com uma parede e longe de espaços abertos. Fornecer divisórias na gaiola pode fazer o camundongo sentir-se mais seguro.
- Brinquedos de atividade como cordas, objetos de borracha resistentes a mordidas que possam ser autoclavados podem ser introduzidos.

ANEXO I

- Uma caixa de nidificação sólida e opaca com uma parte superior pode ser colocada na gaiola de ratos permitindo que eles a utilizem como plataforma.
- Cobaias demonstram boa aceitação por caixas de papelão ou plástico que fornecem um abrigo escuro e escondido de outros indivíduos. Estas caixas servem como um lugar para se esconder e como um lugar seguro para o parto.
- A presença de abrigos reduz a agressividade em hamsters. Estes abrigos permitem que eles se escondam um dos outros ajudando a minimizar encontros agressivos. Abrigos que simulem um túnel escuro é o mais desejável.
- Rodas de correr podem ser oferecidas para camundongos e hamsters e os animais normalmente as utilizam extensivamente. No entanto, existem controvérsias sobre os benefícios destas rodas. Elas podem ser vistas como uma maneira de proporcionar atividade física, mas por outro lado pode ser considerado como um facilitador para um comportamento obsessivo já que os animais se exercitam mais do que normalmente se exercitariam na natureza.

Estimulação olfatória:

- Marcações olfativas são muito importantes para roedores e são a base do desenvolvimento de sua organização social. A agressividade em machos é comum após a limpeza da caixa, pois a marcação do cheiro territorial é alterada.
- Atenção especial deve ser dada ao fato de que ratos são predadores naturais de camundongos, portanto, o cheiro de ratos causará uma reação de medo no camundongo. Logo, essas duas espécies não devem ser alojadas juntas.
- Adicionar papel toalha após a limpeza da gaiola reduz a carga olfatória e encoraja o comportamento de nidificação.
- As cobaias e os hamsters devem ser capazes de manter contato olfativo com outros animais familiares.

Promoção de tipos de comportamento naturais:

- A luz ambiente deve funcionar em ciclo dia-noite, preferencialmente com escurecimento gradual para imitar o nascer e o por do sol para os roedores. Sistemas de dimerização podem ser previstos.
- O fornecimento de materiais para nidificação tais como lenços, feno, papel toalha, tiras de papel ou algodão, deve ser incentivado. Os camundongos construirão ninhos com esses itens com entusiasmo, mas também utilizam para se abrigarem da luz ou outros estímulos estressantes.
- Tipos de comportamento naturais como cavar e criar túneis podem ser estimulados se for fornecido um substrato que tenha vários centímetros de espessura. Objetos para mastigar, tais como blocos de madeira com buracos pré-existentes, bolas de golfe ou bolinhas de

ANEXO I

madeira, blocos de madeira macia, palha ou tubos de papelão. Tubos de papelão também fornecerão abrigo e uma oportunidade para escalar.

- Forneça aos ratos uma maior complexidade estrutural utilizando abrigos com plataformas.

Enriquecimento ambiental para coelhos

Social:

- Em seu habitat, os coelhos são animais sociais e em muitos casos vivem em tocas de até 100 ou mais animais de várias idades. Alojamento em grupos proporciona aos animais a oportunidade de um comportamento social mais próximo do natural, incluindo uma ampla oportunidade para o exercício adequado, limpeza mútua e melhora no bem-estar geral. Coelhos alojados em grupo realizam uma higiene grupal que é um comportamento importante e aumenta a coesão do grupo.
- Os coelhos podem também ser alojados em pares com gaiolas interconectadas. Animais alojados individualmente devem ter contato visual e olfativo com outros coelhos.

Humano-animal:

- O homem também pode ser uma fonte de enriquecimento social. A remoção frequente da gaiola para manuseio e o contato com os cuidadores é recomendada. Deve se ter uma relação de carinho com os animais, manuseando-os com segurança e minimizando o estresse da contenção.

Alimento:

- Feno pode ser fornecido no topo da gaiola para que o coelho fique em uma posição bípede para sua obtenção. Uma variedade de suplementos alimentares como cenoura, maçã, verduras e outros vegetais podem ser servidas em rotação além da ração formulada balanceada. Agrados alimentares podem ser espalhados pelo local onde os animais estão confinados para permitir a busca por comida, sempre que o proposta em estudo e o procedimento operacional padrão permitirem.

Ambiente físico:

- A dimensão dos recintos de alojamento deve permitir que os diversos movimentos dos animais. Plataformas ou caixas colocadas entre 20 e 30 cm acima do chão fornecem um bom abrigo escuro. Bolas e pesos de polipropileno resistentes a mordidas servem como bons brinquedos, bem como correntes de aço inoxidável suspensas com madeiras penduradas.

Estimulação olfatória:

ANEXO I

- O coelho tem uma alta sensibilidade olfativa o que é de extrema importância no comportamento social e sexual. Portanto deve-se evitar o uso de substâncias químicas de odor forte. Os coelhos devem ser capazes de manter contato olfativo com outros animais familiares.

Promoção de tipos de comportamento naturais:

- Galhos, gravetos e caixas de papelão não tóxicos devem ser fornecidos para os animais roerem. Caixas de nidificação devem ser preenchidas com feno, palha ou retalhos de papel para as fêmeas prenhes.

Tabela 7 - Estratégias de enriquecimento ambiental para espécies animais utilizados em pesquisas.

REFERÊNCIAS

American College of Veterinary Anesthesiologists. Monitoring standards.

<http://www.acva.org/professional/Position/monitor.htm>

American College of Veterinary Anesthesiologists' Position Paper on the Treatment of Pain in Animals (1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 213:628–630.

<http://www.acva.org/professional/Position/pain.htm>

Bate MJ (ed) (2001). *Pain and Practical Pain Therapy, Proceedings of the ANZCCAR T/AVERT Conference*, Melbourne.

Buchanan KC, Burge RR and Ruble GR (1998). Evaluation of injectable anaesthetics for major surgical procedures in guinea pigs. *Contemporary Topics* 37:58–63.

Grant C, Summersides GE and Kuchel TR (2001). A xylazine infusion regimen to provide analgesia in sheep. *Laboratory Animals* 35:277–281.

Harvey-Clark CJ, Gillespie K and Riggs KW (2000). Transdermal fentanyl compared with parenteral buprenorphine in post-surgical pain in swine: a case study. *Laboratory Animals* 34:386–398.

Hawk CT, Leary SL, Morris TH. *Formulary for laboratory animals*. 3a. ed., Blackwell 2005, Ames, Iowa, EUA

Hellyer PW (2002). Treatment of pain in dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220(2):212–215.

Husby P, Heltne JK, Koller M-E, Birkeland S, Westby J, Fosse R and Lund T (1997). Midazolam–fentanyl–isoflurane anaesthesia is suitable for haemodynamic and fluid balance studies in pigs. *Laboratory Animals* 32:316–323.

Lascelles BDX (1996). Advances in the control of pain in animals. *Veterinary Annual* 36:1–15.

Livingston A (2002). Ethical issues regarding pain in animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221(2):229–233.

Machin KL (2001). Fish, amphibian, and reptile anaesthesia. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 4(1):19–33.

Mathews KA (ed) (2000). *Management of pain. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 30, WB Saunders, Philadelphia.

Muir WW and Woolfe CJ (2001). Mechanisms of pain and their therapeutic implications. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219(10):1346–1355.

Phifer CB and Terry LM (1986). Use of hypothermia for general anesthesia in preweaning rodents. *Physiology and Behaviour* 38:887–890.

ANEXO I

Richardson CA and Flecknell PA (2005). Anaesthesia and postoperative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: Are we making progress? *Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)* 33:119–127.

Rodriguez NA, Cooper DM and Risdahl JM (2001). Antinociceptive activity of and clinical experience with buprenorphine in swine. *Contemporary Topics* 40:17–20.

Roughan JV and Flecknell PA (2001). Behavioural effect of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain* 90:65–74.

Roughan JV and Flecknell PA (2002). Buprenorphine: a reappraisal of its antinociceptive effects and therapeutic use in alleviating post-operative pain in animals. *Laboratory Animals* 36:322–343.

Sanders RD, Patel N, Hossain M, Ma D and Maze M (2005). Isoflurane exerts antinociceptive and hypnotic properties at all ages in Fischer rats. *British Journal of Anaesthesia* 95:393–399.

Stetter MD (2001). Fish and amphibian anesthesia. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 4(1):69–82.

Stevens CW, Klopp AJ and Facello JA (1994). Analgesic potency of mu and kappa opioids after systemic administration in amphibians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 269:1086–1093.

Stevens CW, MacIver DN and Newman LC (2001). Testing and comparison of non-opioid analgesics in amphibians. *Contemporary Topics* 40:23–27.

Tasker RAR, Connell BJ, Ross SJ and Elson CM (1997). Development of an injectable sustained-release formulation of morphine: antinociceptive properties in rats. *Laboratory Animals* 32:270–275.

Underwood WJ (2002). Pain and distress in agricultural animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221(2):208–211.

Volker D, Bate M, Gentle R and Garg M (2000). Oral buprenorphine is anti-inflammatory and modulates the pathogenesis of streptococcal cell wall polymer-induced arthritis in the Lew/SNN rat. *Laboratory Animals* 34:423–429.

Wilkinson AC, Thomas ML and Morse BC (2001). Evaluation of a transdermal fentanyl system in Yucatan miniature pigs. *Contemporary Topics* 40:12–16.

Recommended texts

Flecknell P and Waterman-Pearson A (eds) (2000). *Pain Management in Animals*, WB Saunders, London.

Flecknell P (1996). *Laboratory Animal Anaesthesia*, 2nd edition, Academic Press, London.

ANEXO I

Kohn DF, Wixson SK, White WJ and Benson GJ (eds) (1997). *Anaesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*, American College of Laboratory Animal Medicine Series, Academic Press, San Diego.

Recursos educacionais e websites

Flecknell P. Digital veterinary anaesthesia images and videos.

<http://www.digires.co.uk/>

International Veterinary Information Services (IVIS).

<http://www.ivis.org/home.asp>

Oklahoma State University (2003). *Undergraduate Anesthesia Manual*, College of Veterinary Medicine.

<http://www.cvm.okstate.edu/Courses/vmed5412/default.htm>

The Virtual Anesthesia Machine.

<http://vam.anest.ufl.edu/index.html>

Wong P (2003). *The Virtual Anaesthesia Textbook—Veterinary Anaesthesia*.

<http://www.virtual-anaesthesia-textbook.com/vat/vet.html>

Bazin JE, Constantin JM and Gindre G (2004). Laboratory animal anaesthesia: influence of anaesthetic protocols on experimental models. *Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation* 23:811–818.

Bette M, Schlimme S, Mutters R, Menendez S, Hoffmann S and Schultz S (2004). Influence of different anaesthetics on pro-inflammatory cytokine expression in rat spleen. *Laboratory Animals* 38:272–279.

Elena G, Amerio N, Ferrero P, Bay ML, Valenti J, Colucci D and Puig NR (2003). Effects of repetitive sevoflurane anaesthesia on immune response, selected biochemical parameters and organ histology in mice. *Laboratory Animals* 37:193–203.

Kissin I (2000). Preemptive analgesia. *Anesthesiology* 93:1138–1143.

Milross CG, Peters LJ, Hunter NR, Mason KA, Tucker SL and Milas L (1996). Polarographic pO₂ measurements in mice: effect of tumor type, site of implantation and anesthesia. *Radiation Oncology Investigation* 4:108–114.

NHMRC (National Health and Medical Research Council) (2004). *Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes*, 7th edition, NHMRC, Canberra.

Schofield JC and Williams VM (2002). *Analgesic Best Practice for the Use of Animals in Research and Teaching — An Interpretative International Literature Review*, Biosecurity New Zealand.

ANEXO I

<http://www.biosecurity.govt.nz/animal-welfare/analgesic-practice.htm>

Shafford HL, Hellyer PW and Turner AS (2004). Intra-articular lidocaine plus bupivacaine in sheep undergoing stifle arthrotomy. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 31:1–26.

Thompson JS, Brown SA, Khurdayan V, Zeynalzadedan A, Sullivan PG and Scheff SW (2002). Early effects of tribromoethanol, ketamine/xylazine, pentobarbital and isoflurane anesthesia on hepatic and lymphoid tissue in ICR mice. *Comparative Medicine* 52:63–67.

Brown MJ, Pearson PT and Tomson FN (1993). Guidelines for animal surgery in research and teaching. *American Journal of Veterinary Research* 54:1544–1559.

Hawkins P, Morton DB, Bevan R, Heath H, Kirkwood J, Pearce P, Scott L, Whelan G and Webb A (2004). Husbandry refinements for rats, mice, dogs and non-human primates used in telemetry procedures. Report of the Joint Working Party on Refinement. *Laboratory Animals* 38:1–10.

LASA /UFAW (Laboratory Animal Science Association and Universities Federation for Animal Welfare) (1989). Guidelines on the Care of Laboratory Animals and their Use for Scientific Purposes. III Surgical procedures. UFAW, Potters Bar.

Morton DB, Hawkins P, Bevan R, Heath H, Kirkwood J, Pearce P, Scott L, Whelan G and Webb A (2003). Refinements in telemetry procedures. Report of the Joint Working Party on Refinement. *Laboratory Animals* 37:261–299.

NHMRC (National Health and Medical Research Council) (1997). Guidelines on the Use of Animals for Training Surgeons and Demonstrating Surgical Equipment and Techniques.

<http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/ea13syn.htm>

NIH (National Institutes of Health) (2005). Intramural Research Program. Guidelines for Survival Rodent Surgery.

<http://oacu.od.nih.gov/ARAC/surguide.pdf>

NSW Animal Research Review Panel (2003). Use of Animals in Post-Graduate Surgical Training (revised).

<http://www.animalethics.org.au/reader/animals-teaching/arrp-postgraduate-training.htm>

Recommended texts

Brown PA and Hoogstraten-Miller S (2004). Principles of aseptic rodent survival surgery. Part I & II – General training in rodent survival surgery. In: *Laboratory Animal Medicine and Management*, Reuter JD and Suchow MA (eds), International Veterinary Information Service (IVIS), Ithaca, NY.

<http://www.ivis.org>

Cocchetto DM and Bjornsson TD (1983). Methods for vascular access and collection of body fluids from the laboratory rat. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 72:465–492.

ANEXO I

Flecknell P (1996). *Laboratory Animal Anaesthesia*, 2nd edition, Academic Press, London.

Flecknell P and Waterman-Pearson A (2000). *Pain Management in Animals*, WB Saunders, London.

Foley PL (2004). Common surgical procedures in rodents. In: *Laboratory Animal Medicine and Management*, Reuter JD and Suchow MA (eds), International Veterinary Information Service (IVIS), Ithaca, NY.

<http://www.ivis.org>

Harrison FA (1995). *Surgical Techniques in Experimental Farm Animals*, Oxford University Press, Oxford.

Gardiner TW and Toth LA (1999). Stereotactic surgery and long-term maintenance of cranial implants in research animals. *Contemporary Topics* 38:56–63.

Gay WI (ed) (1986). Part A: Patient care, vascular access and telemetry. In: *Methods of Animal Experimentation*, vol 7: Research Surgery and Care of the Research Animal, Academic Press, Orlando, 143–241.

Hecker JF (1985). *The Sheep as an Experimental Animal*, Academic Press, San Diego.

Kaplan HM and Timmons EH (1979). *The Rabbit – A Model for the Principles of Mammalian Physiology and Surgery*, Academic Press, New York. Part III Surgical procedures.

Lumley JSP, Green CJ, Lear P and Angell-James JE (1990). *Essentials of Experimental Surgery*, Butterworths, London.

National Research Council (2003). *Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research*, National Academies Press, Washington, DC.

Swindle MM (1998). *Surgery, Anesthesia and Experimental Techniques in Swine*, Iowa State University Press, Ames.

Swindle MM and Adams RJ (1988). *Experimental Surgery and Physiology: Induced Animal Models of Human Disease*, Williams and Wilkins, Baltimore.

Swindle MM, Nolan T, Jacobson A, Wolf P, Dalton MJ and Smith AC (2005). Vascular access port (VAP) usage in large animal species. *Contemporary Topics* 44:7–17.

Waynforth HB and Flecknell PA (1992). *Experimental and Surgical Technique in the Rat*, 2nd edition, Academic Press, London.

Education resources

DASIE (Dog Abdominal Surrogate for Instructional Exercises): A laminated fabric and polyurethane model designed and constructed to resist cutting, and to hold sutures in a manner similar to normal tissues. Used for practising aseptic technique, instrument handling, suturing and ligation. Available from DASIE International.

ANEXO I

E-mail: dasieinternational@hotmail.com

Digital Material for Trainers: A series of 12 digital video CDs covering handling, procedures, anaesthesia and surgery for common laboratory animals. Three CDs include interactive course notes. Purchasing information

available at: <http://www.digires.co.uk/index.html>

Pain Assessment in the Rat. John Roughan and Paul Flecknell developed this CD that contains movies illustrating a behaviour-based pain scoring scheme in rats. Purchasing information available at: <http://www.lal.org.uk/digital/digital.html>

Principles of Surgery: This website from the University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine includes videos of suture patterns and techniques.

<http://cal.vet.upenn.edu/projects/surgery/index.htm>

Training in Basic Bi methodology for Laboratory Mice: National Human Genome Research Institute, Office of Laboratory Animal Medicine, National Institutes of Health. Request for copies should be sent to: rodent-cd@mail.nih.gov

Training in Survival Rodent Surgery: A CD-ROM that has been developed by the NIH Animal Research Advisory Committee to assist in the development of proper surgical skills. It has three elements: simple suture patterns, rodent survival surgery and special considerations for aseptic surgery in transgenic mice.

Bazin J-E, Constantin J-M and Gindre G (2004). Laboratory animal anaesthesia: influence of anaesthetic protocols on experimental models. *Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation* 23:811–818.

Benazon D (1974). Hypothermia. In: *Scientific Foundations of Anaesthesia*, 2nd edition, Scurr C and Feldman S (eds), William Heinemann Medical Books Ltd, London, 344–356.

Ben-Eliyahu S, Shakhar G, Rosenne E and Levison Y (1999). Hypothermia in barbiturate anesthetized rats suppresses natural killer cell activity and compromises resistance to tumour metastasis. *Anesthesiology* 91:732–740.

Bonnet F and Marret E (2005). Influence of anaesthetic and analgesic techniques on outcomes after surgery. *British Journal of Anaesthesia* 95:52–58.

Bradfield JF, Schachtman TR, McLaughlin RM and Steffen EK (1992). Behavioral and physiological effects of inapparent wound infection in rats. *Laboratory Animal Science* 42:572–578.

Chindavijak B, Belpaire FM, De Smet F and Bogaert MG (1988). Alteration of the pharmacokinetics and metabolism of propranolol and antipyrine elicited by indwelling catheters in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 246:1075–1079. Part III Surgical procedures

ANEXO I

Chuang MS, Orvieto M, Laven BM, Gerber GS, Wardrip C, Ritch C and Shalhav A (2005). Comparison of external catheters with subcutaneous vascular access ports for chronic vascular access in a porcine model. *Contemporary Topics* 44:24–27.

Cooper DM, McIver R and Bianco R (2000). The thin blue line: a review and discussion of septic technique and post procedural infection in rodents. *Contemporary Topics* 39:27–32.

Cunliffe-Beamer, TL (1993). Applying principles of aseptic surgery to rodents. *AWIC Newsletter* 4(2).

Danneman PJ, Griffith JW, Beyers TM and Lang CM (1988). Renal and vascular damage associated with indwelling vascular access devices. *Laboratory Animal Science* 38:511.

Dantzer R (2001). Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain, Behavior and Immunity* 15:7–24.

Deng J, St.Claire M, Everett C, Retiman M and Star RA (2000). Buprenorphine given after surgery does not alter renal ischemia/reperfusion injury. *Comparative Medicine* 50:628–632.

Einstein R, Billing RL, Singh A and Chin I (2004). Implanted telemetry transmitters alter the noradrenergic response in vas deferens from mice. *Alternatives to Laboratory Animals* 32:171–176.

Fagin KD, Shinsako J and Dallman MF (1983). Effects of housing and chronic annulation on plasma ACTH and corticosterone in the rat. *American Journal of Physiology* 245:E515–E520.

Freeman AJ, Gardner CJ and Dodds MG (1990). An improved method for bonding heparin to intravascular cannulae. *Journal of Pharmacological Methods* 23:7–11.

Hampshire VA, Davis JA, McNickle CA, Williams L and Eskildson H (2001). Retrospective comparison of rat recovery weights using inhalation and injectable anaesthetics, nutritional and fluid supplementation for right unilateral neurosurgical lesioning. *Laboratory Animals* 35:223–229.

Hayes KE, Raucci JA, Gades NM and Toth LA (2000). An evaluation of analgesic regimens for abdominal surgery in mice. *Contemporary Topics* 39:18–23.

Heavner JE (1994). Physiological effects of anesthetics and analgesics. In: *Research Animal Anesthesia, Analgesia and Surgery*, Scientists Centre for Animal Welfare, Smith AC and Swindle MM (eds), Washington DC, 41–58.

Heindorff H, Almdal T and Vilstrup H (1990). Contradictory effects of uncomplicated versus complicated abdominal surgery on the hepatic capacity for urea synthesis in rats. *Journal of Surgical Research* 49:239–243.

Johnson RW (2002). The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87:443–450.

ANEXO I

Kirsch JH, Klaus JA, Blizzard KK, Hurn PD and Murphy SJ (2002). Pain evaluation and response to buprenorphine in rats subjected to sham middle cerebral artery occlusion. *Contemporary Topics* 41:9–14.

Liles JH and Flecknell PA (1993). The effects of surgical stimulus on the rat and the influence of analgesic treatment. *British Veterinary Journal* 149:515–525.

Lockwood LL, Silbert KH, Laudenslager ML, Watkins, LR and Maier SF (1993). Anesthesia induced modulation of in vivo antibody levels: a study of pentobarbital, chloral hydrate, methoxyflurane, halothane and ketamine/xylazine. *Anesthesia and Analgesia* 77:769–774.

http://gestaoderesiduos.ufsc.br/files/2014/10/guia_pratico_descarte_residuos_Butantan.pdf

Messier C, Emond S and Ethier K (1999). New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 63:313–318.

Morris TH (1995). Antibiotic therapeutics in laboratory animals. *Laboratory Animals* 29:16–36.

NHMRC (National Health and Medical Research Council) (2004). Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes, 7th edition, NHMRC, Canberra. Part III Surgical procedures

National Research Council (2003). Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research, National Academies Press, Washington, DC.

Paulose CS and Dakshinamurti K (1987). Chronic catheterisation using vascular access port in rats: blood sampling with minimal stress for plasma catecholamine determination. *Journal of Neuroscience Methods* 22:141–146.

Pearson ML (1996). Guidelines for prevention of intravascular-device-related infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 17:438–473.

Popp MB and Brennan MF (1981). Long-term vascular access in the rat: importance of asepsis. *American Journal of Physiology* 241:H606–H612.

Rembert MS, Smith JA and Hosgood G (2004). A comparison of a forced-air warming system to traditional thermal support for rodent microenvironments. *Laboratory Animals* 38:55–63.

Reyes L, Tinworth KD, Li KM, Yau DF and Waters JA (2002). Observer-blinded comparison of two non-opioid analgesics for postoperative pain in piglets. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 73:521–528.

Roughan JV and Flecknell PA (2000). Effects of surgery and analgesic administration on spontaneous behaviour in singly housed rats. *Research in Veterinary Science* 69:283–288.

Roughan JV and Flecknell PA (2003). Evaluation of a short duration behaviour-based postoperative pain scoring system in rats. *European Journal of Pain* 7:397–406.

ANEXO I

Rowland RR, Reyes E, Chuhwuocha R and Tokuda S (1990). Corticosteroid and immune responses of mice following mini-osmotic pump implantation. *Immunopharmacology* 20:187–190.

Russel, W.M.S.; Burch, R.L. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, London.

Salo M (1992). Effects of anaesthesia and surgery on the immune response. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 36:201–220.

Sampath LA, Saborio DV, Yaron I and Modak S (2001). Safety and efficacy of an improved antiseptic catheter impregnated intraluminally with chlorhexidine. *Journal of Infusion Nursing* 24:395–403.

Sharp J, Zammit T, Azar T and Lawson D (2003). Recovery of male rats from major abdominal surgery after treatment with various analgesics. *Contemporary Topics* 42:22–27.

Sherertz RJ, Carruth WA, Marosok RD, Espeland MA, Johnson RA and Solomon DD (1995). Contribution of vascular catheter material to the pathogenesis of infection: the enhanced risk of silicone in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research* 29:635–645.

Stasiak KL, Maul D, French E, Hellyer PW and Vandewoude S (2003). Species-specific assessment of pain in laboratory animals. *Contemporary Topics* 42:13–20.

Stewart LSA and Martin WJ (2003). Influence of postoperative analgesics on the development of neuropathic pain in rats. *Comparative Medicine* 53:29–36.

Thornton PD and Waterman-Pearson AE (1999). Quantification of pain and distress responses to castration in young lambs. *Research in Veterinary Science* 66:107–118.

Thurmon JC and Benson GJ (1987). Pharmacological consideration in selection of anesthetics for animals. *Journal of the American Veterinary Association* 191:1245–1253.

Tornatzky W and Miczek KA (1993). Long term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Physiology and Behavior* 53:983–993.

van Ruiven R, Meijer GW, van Zutphen LFM and Ritskes-Hoitinga J (1996). Adaptation period of laboratory animals after transport: a review. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 23:185–190.

Wyatt I, Coutts CT, Foster PM, Davies DT and Elcombe CR (1995). The effect of implantation of osmotic pumps on rat thyroid hormone and testosterone levels in the plasma, an implication for tissue 'S' phase studies. *Toxicology* 95:51–54.

ANEXO I

Tabela 1 A: Locais de coleta de sangue e recomendações para roedores e coelho.

Via	Veia auricular	Amputação da cauda**	Veia caudal	Sinus retro orbital*	Veia jugular	Punção cardíaca*	Veia facial	Veia safena
Cobaia	-	-	-	-	+	terminal	-	++
Hamster	-	-	-	+	+	terminal	-	++
Camundongo	-	+++	++	+	-	terminal	+++	+++
Coelho	+++	-	-	-	+	terminal	-	+
Rato	-	-	+++	-	+	terminal	++	++

- não recomendado; + via possível; ++ via aceitável; +++ via de preferência; * somente sob anestesia; ** Somente sob anestesia.

Tabela 1B: – Métodos e vias comuns de administração de substâncias nos roedores e lagomorfos (sítio de administração, máximo de volume aceito e tamanho da agulha)

Espécies	Subcutâneo	Intramuscular	Intraperitoneal	Intravenoso
CAMUNDONGO	Dorso-cervical, 2-3 mL, Agulha com calibre < 20 G	Músculo quadríceps/ coxa traseira, 0,05 mL, Agulha com calibre < 23 G	Quadrante abdominal inferior direito-2-3 mL, Agulha com calibre < 21 G	Veia lateral da cauda, 0,2 mL, Agulha com calibre < 25 G
RATO	Dorso-cervical 5-10 mL, Agulha com calibre < 20 G	Quadriceps/ coxa traseira, 0,3 mL, Agulha com calibre < 21 G	Quadrante abdominal inferior direito -5-10 mL, Agulha com calibre < 21 G	Veia lateral da cauda, sublingual, peniana, jugular (incisão), femoral (incisão). 0,5 mL, Agulha com calibre < 23 G
HAMSTER	Dorso-cervical, 3-4 mL, Agulha com calibre < 20 G	Músculo quadríceps/ coxa traseira, 0,1 mL, Agulha com calibre < 23 G	Quadrante abdominal inferior direito - 3-4 mL, Agulha com calibre < 21 G	Veia femoral ou jugular (incisão), 0,3 mL, <25 G
COBAIO	Dorso-cervical, 5-10 mL, Agulha com calibre < 20 G	Músculo quadríceps/ coxa traseira, 0,3 mL, Agulha com calibre < 21 G	Quadrante abdominal inferior direito - 10-15 mL, Agulha com calibre < 21 G	Veia da orelha, Veia safena, Veia peniana dorsal, 0,5 mL, Agulha com calibre < 23 G
COELHO	Dorso-cervical, 30-50 mL, Agulha com calibre < 20 G	Músculo quadríceps/ coxa traseira, 0,5-1.0 mL, Agulha com calibre < 20 G	Quadrante abdominal inferior direito -50-100 mL, Agulha com calibre < 20 G	Veia marginal da orelha, 1-5 mL, Agulha com calibre < 21 G

Fonte: Adaptado de CCAC (1993)

Tabela 2: Procedimento para minimizar a dor e o distresse ao administrar substâncias

<i>Administração de uma substância nova</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Investigue vários métodos alternativos de administração de forma a identificar a via mais adequada. - Investigue as propriedades físico-químicas da substância, tais como solubilidade, estabilidade, pH, grau de irritação e toxicidade. - Realize uma avaliação de riscos para a preparação e uso da substância: identifique riscos à qualidade de vida do animal e incorpore estratégias de refinamento para minimizar efeitos adversos. - Considere a avaliação <i>in vitro</i> de substâncias pouco estudadas, antes do estudo <i>in vivo</i>. - Realize um estudo piloto para a escolha do modelo animal, escolha da técnica, dose, via e frequência de administração corretos, bem como outros aspectos relativos às propriedades biológicas, como metabolismo e via de excreção da substância.
<i>Volume da substância e a frequência de administração</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Investigue o uso de um solvente/veículo que seja fisiologicamente compatível e adequado para a via de administração. - Prepare uma estratégia de monitoramento adequada para o período após a administração. - Certifique-se de que a frequência de monitoramento seja adequado para detectar tanto os efeitos esperados quanto os inesperados e que haja um plano para controlar a dor e o distresse do animal.
<i>Via de administração</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Use uma via adequada para administrar a substância, de modo a minimizar o impacto no animal. - Para substâncias que necessitam administração frequente, dê preferência à via oral, associando-as ao alimento ou água. - Para substâncias que necessitam administração IV frequente, considere o uso de um cateter venoso de permanência. - Para substâncias que necessitam administração SC ou IP frequente, considere o uso de uma minibomba osmótica ou um implante.
<i>Animal</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Identifique a espécie, linhagem, sexo, idade, peso corporal e estado de saúde. - Aclimate o animal ao local e ao pessoal. - Treine o animal para o procedimento de manuseio e imobilização antes de iniciar estudos com administração de substâncias.
<i>Técnica</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Realize uma avaliação de riscos para o uso da técnica e qualquer imobilização relacionada. - Identifique riscos à qualidade de vida do animal e incorpore estratégias de refinamento para minimizar efeitos adversos. - Identifique e trate deficiências no treinamento e no uso dos equipamentos necessários para realizar a técnica. - Monitore o animal para os efeitos conhecidos ou inesperados, incluindo o impacto na qualidade de vida do animal.
<i>Pessoal</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Identifique o pessoal experiente e capacitado e o pessoal com deficiências no treinamento. - Elimine as deficiências no conhecimento e capacitação com treinamento e supervisão. - Identifique o pessoal com responsabilidade para o monitoramento animal mesmo após o expediente, nos fins de semana e feriados.
<i>*IP = intraperitoneal; IV = intravenosa; SC = subcutânea</i>

ANEXO I

Tabela 6 – Procedimentos para minimizar a dor e o desconforto ao modificar o comportamento

<i>Procedimentos gerais</i>
<ul style="list-style-type: none">- Em todos os casos, limite a duração e severidade do evento.- Em caso de imobilização, verifique as Diretrizes do CONCEA- Em caso de perturbação e estresse, permita que o animal reaja e controle.- Em caso de medo ou luta, permita evitação ou escape.
<i>Imobilização</i>
<ul style="list-style-type: none">- O método de imobilização utilizado deve ser apropriado para a espécie e permitir que o animal descanse em uma posição natural. Por exemplo, um roedor pode ser colocado em um saco folgado, que por sua vez é colocado em uma caixa ou tubo, enquanto um primata não humano poderia sentar em uma cadeira de imobilização.- Os animais devem ser acostumados adequadamente (“condicionados comportamentalmente”) ao equipamento de imobilização. O indicador ideal de aceitação é o movimento de entrada voluntário do animal no equipamento.
<i>Alojamento individual e em grupo</i>
<ul style="list-style-type: none">- Quando novos grupos ou pares sociais estão prestes a serem formados, pode ser possível alojar os animais com bastante proximidade para permitir a familiarização e o estabelecimento de hierarquias de dominância antes que eles tenham contato físico.- Em algumas espécies (ex.: camundongo), machos pós-pubescentes lutam e ferem outros machos. Nesses casos, os animais não devem ser alojados juntos.- Quando o alojamento individual for inevitável, os animais devem ainda ter contato visual, auditivo e olfatório. Tratadores podem ser uma fonte de enriquecimento social.
<i>Déficit neurológico induzido</i>
<ul style="list-style-type: none">- A necessidade científica de induzir déficits debilitantes em animais precisa ser justificada rigorosamente, e os pesquisadores necessitam demonstrar que são capazes de fornecer cuidado especial que esses animais requerem.- O número de animais com déficits neurológicos induzidos deve ser minimizado.- Mamíferos devem ser substituídos por espécies menos sencientes, não mamíferas sempre que possível.- O protocolo de pesquisa deve ser refinado para reduzir ou eliminar dor, desconforto e mortalidade.
<i>Desfechos humanizados</i>
<ul style="list-style-type: none">- A presença de lesões, doença ou alteração severa de comportamento durante a imobilização necessita remoção temporária ou permanente do animal do aparato.- Grupos ou pares sociais incompatíveis devem ser substituídos.- Animais que perdem mais do que 10% do peso corporal (de forma aguda) ou 15% do peso corporal (mais lentamente) com protocolos de acesso restritos a alimento ou água devem ser removidos do protocolo de pesquisa. Os critérios de desfecho para casos específicos devem ser justificados cientificamente e aprovados pelo comitê de ética para uso animal.- Animais apresentando sinais de desidratação, que incluam sede, secura das membranas da mucosa, produção reduzida de urina, consumo reduzido de alimento, perda de elasticidade da pele, letargia ou choque/colapso cardiovascular devem ser removidos da proposta em estudo.

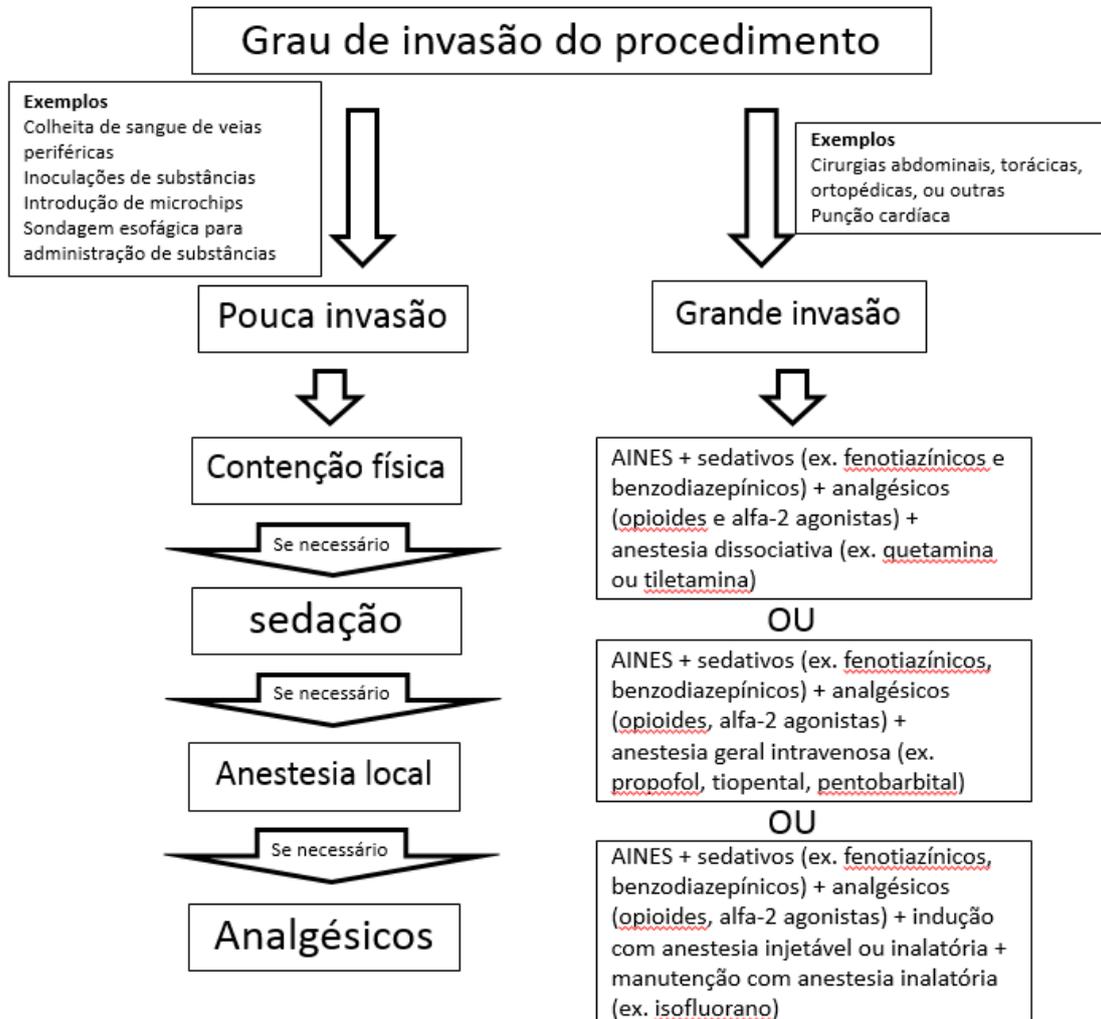


Figura 1 - Exemplo de opções de controle da dor classificados de acordo com o potencial do procedimento em resultar dor ou estresse ("grau de invasividade").

ANEXO I

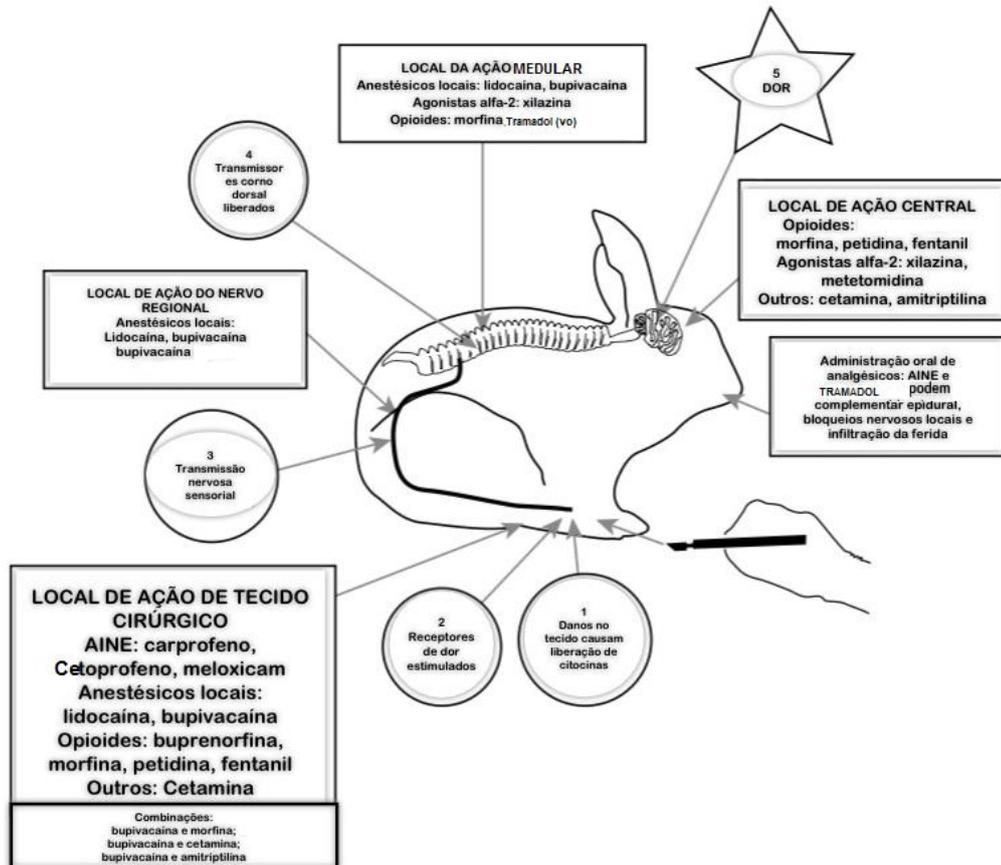


Figura 2 – Locais de ação de agentes analgésicos nos mecanismos da dor.

Fonte: Schofield e Williams (2002)

<http://www.biosecurity.govt.nz/animal-welfare/analgesic-practice.htm>

ANEXO I

Tabela8: Minimizando os riscos cirúrgicos ao bem-estar animal

MAIORES RISCOS	POSSÍVEIS CAUSAS	AÇÕES CORRETIVAS
Dor	Escolha inadequada de anestésicos ou analgésicos	- Selecione agentes apropriados para a espécie e tipo de procedimento
	Controle inadequado da dor	- Desenvolva um plano de controle da dor - Monitore e avalie a eficácia
Má circulação do sangue (má perfusão tecidual)	Perda de sangue	- Utilizar adequada técnica cirúrgica e controle de hemostase - Monitorar a frequência cardíaca e tempo de preenchimento capilar - Manter a volemia com sangue ou fluidos de reposição - Repor a perda de sangue >10% do volume de circulação
	Dose excessiva de analgésicos depressão cardíaca	- Monitorar a profundidade da anestesia, função cardiovascular e perfusão tecidual, e ajuste a dose anestésica - Administrar estimulantes cardíacos se necessário
	Hipotermia	- Ver "Hipotermia" abaixo

ANEXO I

	<p>Desidratação</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Manter a hidratação com fluidos aquecidos IV ou SC (ex.: solução de Ringer lactato ou NaCl 0,9% - 10 mL/kg/h no intra-operatório; manutenção diária de 40-80 mL/kg/24h) - Manter os tecidos expostos umedecidos com solução salina
	<p>Desequilíbrio ácido-base e eletrolíticos</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ver “alterações metabólicas” abaixo
<p>Má oxigenação</p>	<p>Hipóxia devido a depressão respiratória causada por dose excessiva de anestésicos</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Monitorar a profundidade da anestesia, frequência respiratória e cor das membranas mucosas - Administrar oxigênio - Fornecer suporte respiratório mecânico - Reduzir a dose de anestesia - Administrar estimulante respiratório - Se a intervenção cirúrgica tiver terminado, administrar agente para reverter o anestésico, se aplicável
	<p>Hipóxia devido a obstrução das vias aéreas</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Verificar a desobstrução das vias aéreas - Remover qualquer obstrução mecânica, como excesso de muco, sangue ou corpo estranho - Verificar a posição do corpo para garantir que o movimento respiratório não seja restringido ou as vias aéreas obstruídas

ANEXO I

	Hipóxia tecidual ligada a má perfusão tecidual	- Ver “Má circulação do sangue” acima
Hipotermia	Agentes anestésicos	- Monitorar a temperatura do corpo durante a intervenção cirúrgica
	Exposição de cavidade do corpo ou tecidos ao ar frio ambiente (sério problema em animais com grande área de superfície em relação ao peso corporal e/ou alta taxa metabólica)	- Limitar a exposição a superfícies frias, especialmente quando o animal estiver anestesiado; deite o animal em material isolante e forneça fonte de calor (ex.: colchão térmico durante o procedimento cirúrgico e recuperação) - manter os tecidos expostos quentes e úmidos - Colocar os animais em um ambiente quente durante a recuperação
	Uso de líquidos parenterais frios	- Administrar fluidos mornos
	Inspiração de ar/gases frios	- Umidificar e aquecer o ar inspirado, se possível

ANEXO I

<p>Alterações metabólicas</p>	<p>Estresse cirúrgico ativa o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal, resultando em glicogenólise e hiperglicemia, e afeta o metabolismo de proteínas, levando ao balanço nitrogenado negativo</p>	<p>- Aclimatar os animais às instalações e ao pessoal para reduzir a ativação da resposta ao estresse</p> <p>- Monitorar e controlar os fatores propensos a exacerbar a resposta ao estresse da intervenção, principalmente dano ao tecido e dor</p> <p>- Fornecer suporte nutricional para minimizar a glicólise durante o ato operatório e recuperação no pós-operatório</p> <p>- Monitorar o consumo de água e alimento no pós-operatório</p>
	<p>Má perfusão tecidual e hipóxia levam a acidose e perturbações eletrolíticas</p>	
<p>Má recuperação</p>	<p>Recuperação retardada do anestésico devido a dose excessiva ou metabolismo de fármacos comprometido associado a hipotermia, perfusão tecidual reduzida e comprometimento da função do órgão</p>	<p>- Promover a homeostase metabólica mantendo normotermia e perfusão tecidual adequada e oxigenação</p> <p>- Minimizar a isquemia tecidual durante a intervenção cirúrgica</p> <p>- Minimizar a perda de sangue e desidratação</p> <p>- Monitorar e corrigir os desequilíbrios ácido-base e eletrolíticos durante a intervenção e a recuperação</p>

ANEXO I

	Hipotermia	<ul style="list-style-type: none"> - Monitorar a profundidade da anestesia para evitar dose excessiva - Monitorar e controle complicações potenciais da anestesia, especialmente temperatura do corpo e funções cardiovascular e respiratória
	Má perfusão tecidual	- Ver "Hipotermia" acima
	Má oxigenação	- Ver "Má circulação do sangue" acima
	Desidratação	- Ver "Má oxigenação" acima
	Infecção no pós-operatório	- Ver "Desidratação" acima; também é necessário garantir hidratação adequada no período pós-operatório – monitore se líquidos parenterais são necessários
	Falha na ferida cirúrgica	- Ver "Infecção no pós-operatório" abaixo
	Auto-trauma	- Ver "Falha na ferida cirúrgica" abaixo
	Estresse social	<ul style="list-style-type: none"> - Escolher um anestésico com propriedades de recuperação mais suaves - Melhorar a monitoração e proporcionar alívio à dor apropriado - Melhorar as condições de alojamento

ANEXO I

Infecção no pós-operatório	Colapso na técnica cirúrgica	- Garantir contato auditivo, visual e olfativo com outros animais
	Técnica cirúrgica inadequada	- analisar e revisar os procedimentos; implementar treinamento se necessário
	Hipotermia no perioperatório	- Ver “Hipotermia” acima
	Má perfusão tecidual	- Ver “Má circulação do sangue” acima
	Cateter ou aparelho implantado ou local de saída infectado	- Esterelização eficaz do implante; procedimentos assépticos durante a manutenção do cateter
	Doença pré-existente	- Triagem clínica antes da intervenção cirúrgica
Falha na ferida cirúrgica	Má técnica cirúrgica	- Revisar os procedimentos para garantir o manuseio atraumático do tecido, hemostase eficaz, manutenção de perfusão tecidual e métodos e materiais apropriados para fechamento da ferida - Garantir que técnicas assépticas sejam utilizadas para qualquer procedimento de recuperação ou na manutenção de cateteres intravasculares
	Infecção no pós-operatório	- Ver “Infecção no pós-operatório” acima

Tabela 7: Estratégias de enriquecimento ambiental para espécies animais utilizados em pesquisas.

<p>Roedores</p> <p>Tipo de enriquecimento</p> <p>Social: Ratos e camundongos são melhores alojados aos pares ou grupos, contudo para evitar a agressividade, observada entre os machos, os grupos devem ser formados com indivíduos recém-desmamados que conhecem uns aos outros. Adicionar ou remover um indivíduo pode afetar o bem-estar de todo o grupo.</p> <p>Humano-animal: Permitir que o animal se familiarize com o pesquisador antes do início do trabalho favorece a realização dos ensaios que necessitam repetição.</p> <p>Alimento: Roedores preferem buscar seu próprio alimento. Sempre que possível ofereça alimentos alternativos, além da ração peletizada, de modo que a busca pelo alimento se assemelhe às condições encontradas na natureza.</p> <p>Ambiente físico: Ratos e camundongos têm hábitos noturnos e, portanto é necessário oferecer alternativas para que eles possam se abrigar da luz. A luz ambiente deve funcionar em ciclo dia-noite, preferencialmente com escurecimento gradual para imitar o nascer e o por do sol. Para aumentar o espaço na gaiola pode-se criar diferentes níveis de modo que o animal possa escalar e se exercitar. Para protocolos específicos de reprodução, recomenda-se a oferta de material de nidificação. O fornecimento de diferentes tipos de substratos estimulam tipos de comportamento naturais como cavar, criar tuneis, etc. Qualquer que seja o material adotado para o enriquecimento ambiental, não deve oferecer risco ao animal.</p>
<p>Lagomorfos</p> <p>Tipos de enriquecimento</p> <p>Social: Os coelhos devem ser alojados em pares ou em pequenos grupos de indivíduos compatíveis, sempre que possível. Coelhos machos geralmente brigam quando atingem a maturidade sexual e devem então ser separados, sem, contudo limitar o contato visual e olfativo.</p> <p>Humano-animal: A remoção frequente da gaiola por tratadores para manuseio é recomendada por constituir fonte de enriquecimento ambiental.</p> <p>Alimento: Uma variedade de suplementos alimentares pode ser oferecida alternadamente com a ração balanceada e pode ser posicionada na gaiola de modo a permitir a busca do alimento.</p> <p>Ambiente físico: Áreas elevadas aumentam o uso do espaço vertical, permitem ao animal sentar-se e deitar-se e ainda fornecem abrigo. Correntes de aço inoxidável suspensas, bolas e pesos de plásticos resistentes a mordidas servem como bons brinquedos.</p>

ANEXO I

Tabela 3: Fármacos analgésicos e sedativos mais usados em animais roedores e lagomorfos, com suas respectivas doses, vias e periodicidade de tratamento

FÁRMACOS (VIA) mg/kg	Cobaia	Hamster	Camundongo	Rato	Coelho	Observações
Alfadolona/Alfaxolona	10-20 IV; 40 IP	150 IP	5-20 IV; 90 IP	5-10 IV	6-9 IV*	Alta mortalidade
Alfacloralose	70 IP		114 IP	55-65 IP	80-100 IV	Apenas quando ao final da anestesia se realiza eutanásia
Etomidato			5-10 IV; 30 IP			Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associado a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Fentanil/Etomidato			0,08/18 IP			
Fentanil/Medetomidina				0,3/0,3 IP	0,008/0,33 IV	
Quetamina	44-200 IM*	100-300 IP	50 IV; 44-200 IM; 100-200 IP	44-100 IM; 75 IP	50 IM	* recomenda-se atropina; usar isoladamente apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Acepromazina	125/5 IM, IP, SC	150/5 IM	100/2,5-5 IM, IP	30-75/2,5-3 IM, IP	50-75/1-5 IM, SC	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Azaperone			75/100 IM	50/87		Apenas para contenção; complementar com ¼ a ½ da dose; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Detomidina				60/10 IM machos; 40/5 IM fêmeas		Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Diazepam	100-5 IM, IP	70/2 IP	200 IM/5 IP; 100/5 IP	40-80/5-10 IP	20-40/1-5 IM; 10/2 IV	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Medetomidina	40/0,5 IP	100/0,25 IP	50/1 IP machos; 75/1 IP fêmeas	60-75/0,25-0,5 IP	5 IV/0,35 IM + O ₂ ; 25/0,5 IM	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Midazolam			100/5 IP	75/5 IP	30/0,2 IM	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Xilazina	25-40 IM e 5 SC, IP ou IM	200/10 IP ou 50-150/10 SC ou IM	200 IM e 10 IP* 90-100/10 IM 50/50 IM 80-100/10 IP; 100-150/50-100 IP	40-80/5-10 IP 37/7 IM + 1,25/min e 0,03-0,04/min IV – 12 h 30-90/10-15 IM	20-50/3-10 IM ou SC 10/3 IV ou intranasal	Nas doses mais altas pode ser alcançada a anestesia cirúrgica porém a mortalidade é muito alta; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Midazolam/Xilazina					30/0,2/3 IM	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Xilazina/Acepromazina					35/5/0,75	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser

ANEXO I

						associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Xilazina/Butorfanol					35/5/0,1 IM	
Pentobarbital/clorpromazina			40-60 IP e 25-50 IM			
Pentobarbital/Xilazina	45 IP*/7 IM,					Suplementar com 3-6,5 de pentobarbital IP ou IV quando necessário
Pentobarbital	28-37 IP	90 IP	40-85 IP 40-70 IV Neonatos 5 IP	30-50 IP	28-45 IV ou IP	
Propofol			20-30 IV	10 IV	7,5-15 IV 1,5 + 0,2- 0,6/min	Usado normalmente apenas para indução anestésica, pela curta duração
Tiopental			25-50 IV	30 IV	15-30 IV ou IP	Usado normalmente apenas para indução anestésica, pela curta duração
Tiletamina-Zolazepam	10-60 IM		80	20-40 IP		Usar isoladamente apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associado a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide); não recomendado em coelhos pela nefrotoxicidade
Tiletamina-Zolazepam/Xilazina	40/5 IM	30/10 IP	80-20 IP		15/5 IM ou SC 20/3 IM	Não recomendado em coelhos pela nefrotoxicidade
Tiletamina-Zolazepam/Butorfanol/Xilazina	60 IP/0,1 IM/5 IP					Não recomendado em coelhos pela nefrotoxicidade
Uretano	1500 IP, IV			1000-1500 IP	1000-2000 IP, IV	Apenas quando ao final da anestesia se realiza eutanásia; cancerígeno
Uretano/Alfacloralose				500-800 20-30 min antes/50-60 IP	400-800/80-IV	Apenas quando ao final da anestesia se realiza eutanásia; cancerígeno

Vias: IM – intramuscular; IV – intravenosa, SC – subcutânea e VO - oral

Observações: Esta lista não é completa e as doses são apenas um guia geral. Há uma grande variação entre linhagens e animais. Recomendam-se consultas adicionais sobre sedação e analgesia da espécie alvo. Estes fármacos e doses não garantem sedação ou analgesia eficaz. É necessário adequar os fármacos e posologia de acordo com o grau de invasibilidade do procedimento e o animal e para tal é fundamental a qualificação em reconhecer os sinais de dor na espécie. Outros fármacos não listados podem ser administrados desde que apresentem eficácia em outras espécies e as doses sejam ajustadas.

Fontes: Flecknell (1996), Kohn et al (1997), Hawk et al (2005)

ANEXO I

Tabela 4: Fármacos e associações de fármacos injetáveis mais usados para contenção química e anestesia de animais roedores e lagomorfos, com suas respectivas doses e vias

FÁRMACOS (VIA) mg/kg	Cobaia	Hamster	Camundongo	Rato	Coelho	Observações
Alfadolona/Alfaxolona	10-20 IV; 40 IP	150 IP	5-20 IV; 90 IP	5-10 IV	6-9 IV*	Alta mortalidade
AlfACLoralose	70 IP		114 IP	55-65 IP	80-100 IV	Apenas quando ao final da anestesia se realiza eutanásia
Etomidato			5-10 IV; 30 IP			Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associado a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Fentanil/Etomidato			0,08/18 IP			
Fentanil/Medetomidina				0,3/0,3 IP	0,008/0,33 IV	
Quetamina	44-200 IM*	100-300 IP	50 IV; 44-200 IM; 100-200 IP	44-100 IM; 75 IP	50 IM	* recomenda-se atropina; usar isoladamente apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Acepromazina	125/5 IM, IP, SC	150/5 IM	100/2,5-5 IM, IP	30-75/2,5-3 IM, IP	50-75/1-5 IM, SC	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Azaperone			75/100 IM	50/87		Apenas para contenção; complementar com ¼ a ½ da dose; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Detomidina				60/10 IM machos; 40/5 IM fêmeas		Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Diazepam	100-5 IM, IP	70/2 IP	200 IM/5 IP; 100/5 IP	40-80/5-10 IP	20-40/1-5 IM; 10/2 IV	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Medetomidina	40/0,5 IP	100/0,25 IP	50/1 IP machos; 75/1 IP fêmeas	60-75/0,25-0,5 IP	5 IV/0,35 IM + O ₂ ; 25/0,5 IM	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Midazolam			100/5 IP	75/5 IP	30/0,2 IM	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Xilazina	25-40 IM e 5 SC, IP ou IM	200/10 IP ou 50-150/10 SC ou IM	200 IM e 10 IP* 90-100/10 IM 50/50 IM 80-100/10 IP; 100-150/50-100 IP	40-80/5-10 IP 37/7 IM + 1,25/min e 0,03-0,04/min IV – 12 h 30-90/10-15 IM	20-50/3-10 IM ou SC 10/3 IV ou intranasal	Nas doses mais altas pode ser alcançada a anestesia cirúrgica porém a mortalidade é muito alta; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Midazolam/Xilazina					30/0,2/3 IM	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Xilazina/Acepromazina					35/5/0,75	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Xilazina/Butorfanol					35/5/0,1 IM	
Pentobarbital/clorpromazina			40-60 IP e 25-50 IM			
Pentobarbital/Xilazina	45 IP*/7 IM,					Suplementar com 3-6,5 de pentobarbital IP ou IV quando necessário
Pentobarbital	28-37 IP	90 IP	40-85 IP 40-70 IV Neonatos 5 IP	30-50 IP	28-45 IV ou IP	
Propofol			20-30 IV	10 IV	7,5-15 IV	Usado normalmente apenas para indução anestésica, pela curta

ANEXO I

					1,5 + 0,2-0,6/min	duração
Tiopental			25-50 IV	30 IV	15-30 IV ou IP	Usado normalmente apenas para indução anestésica, pela curta duração
Tiletamina-Zolazepam	10-60 IM		80	20-40 IP		Usar isoladamente apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associado a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide); não recomendado em coelhos pela nefrotoxicidade
Tiletamina-Zolazepam/Xilazina	40/5 IM	30/10 IP	80-20 IP		15/5 IM ou SC 20/3 IM	Não recomendado em coelhos pela nefrotoxicidade
Tiletamina-Zolazepam/Butorfanol/Xilazina	60 IP/0,1 IM/5 IP					Não recomendado em coelhos pela nefrotoxicidade
Uretano	1500 IP, IV			1000-1500 IP	1000-2000 IP, IV	Apenas quando ao final da anestesia se realiza eutanásia; cancerígeno
Uretano/Alfacloralose				500-800 20-30 min antes/50-60 IP	400-800/80-IV	Apenas quando ao final da anestesia se realiza eutanásia; cancerígeno

Vias: IM – intramuscular; IV – intravenosa e SC – subcutânea

Observações: Esta lista não é completa e as doses são apenas um guia geral. Há uma grande variação entre linhagens e animais. Recomendam-se consultas adicionais sobre anestesia da espécie alvo, técnicas e fármacos. Estes fármacos, doses e técnicas não garantem anestesia eficaz. É necessário adequar os fármacos e posologia de acordo com o grau de invasividade do procedimento e o animal e para tal é fundamental a qualificação em reconhecer os planos anestésicos e a monitoração da profundidade anestésica na espécie. Outros fármacos não listados podem ser administrados desde que apresentem eficácia em outras espécies e as doses sejam ajustadas.

Fontes: Flecknell (1996), Kohn et al (1997), Hawk et al (2005).

Tabela 5: Anestésicos inalatórios mais usados e suas respectivas concentrações para indução e manutenção da anestesia de animais roedores e lagomorfos.

	Indução (%)	Manutenção (%)
Isoflurano	4	1-2,5
Sevoflurano	5-8	2,5-4
Halotano	4	1-2

Observações: Esta lista não é completa e as concentrações são apenas um guia geral. Há uma grande variação entre linhagens e animais. Recomendam-se consultas adicionais sobre anestesia da espécie alvo. Estes fármacos e concentrações não garantem anestesia eficaz. É necessário adequar a concentração do fármaco de acordo com o grau de invasividade do procedimento e o animal e para tal é fundamental a qualificação em reconhecer os planos anestésicos e a monitoração da profundidade anestésica na espécie.

Fontes: Flecknell (1996), Kohn et al (1997), Hawk et al (2005)