



**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
VICE - PRESIDÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E
TECNOLÓGICO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO - CEUA**

MANUAL DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS/FIOCRUZ



**ELABORADO PELA CEUA - FIOCRUZ
RIO DE JANEIRO
2008**

MANUAL DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS/FIOCRUZ

PRIMEIRA EDIÇÃO

**RIO DE JANEIRO
2008**

MANUAL DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS/FIOCRUZ

Edição de texto:

Fátima Conceição-Silva

Octavio Augusto França Presgrave

Ministério da Saúde

Ministro: *José Gomes Temporão*

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ

Presidente

Paulo Marchiori Buss

Vice- Presidente de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

José da Rocha Carneiro

Vice - Presidente de Desenvolvimento Institucional e Gestão do Trabalho

Paulo Gadelha

Vice - Presidente de Ensino, Informação e Comunicação.

Maria do Carmo Leal

Vice - Presidente de Serviços de Referência e Ambiente

Ary Carvalho de Miranda

Vice - Presidente de Produção e Inovação em Saúde

Carlos Augusto Grabois Gadelha

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Coordenador: *Octavio Augusto França Presgrave*

Vice - coordenador: *Norma Labarthe*

Fátima Conceição-Silva

Membros atuais:

Belmira Ferreira dos Santos

Bruno L. Diaz

Carmen Penido

Etélcia Moraes Molinaro

Joseli de Oliveira Ferreira

Maria Ignez Elsas

Marcos Vinícius Mota Pires

Tânia Maria Pacheco Schubach

Valber S. Frutuoso

Leonardo José Carvalho

Wildeberg Cal Moreira

Giuliana Schirato

Membros anteriores da CEUA que

participaram da preparação deste manual

Hugo Caire de Castro Faria Neto

Celina Bessa

Elizabeth Malagueño de Santana

Assistente administrativa: *Lara Assunção*

SUMÁRIO

CAPÍTULO	TÍTULO	AUTOR	PÁGINA
	Apresentação	Octavio Augusto França Presgrave	6
	Prefácio	Octavio Augusto França Presgrave	7
1	Breve histórico	Octavio Augusto França Presgrave	9
2	Procedimentos para a apresentação de protocolo à CEUA - Fiocruz	Octavio Augusto França Presgrave	10
3	Notas importantes sobre o preenchimento do formulário CEUA	Fátima Conceição-Silva	12
4	Principais vias e formas de administração / inoculação em animais convencionais	Joseli de Oliveira Ferreira	16
5	Principais fármacos usados em animais de laboratório convencionais - anestésicos e analgésicos	Hugo Caire de Castro Faria Neto e Belmira Ferreira dos Santos	20
6	Recomendações para a preparação de anticorpos poli e monoclonais	Elizabeth Malagueño de Santana	28
7	Sangria	Octavio Augusto França Presgrave e Belmira Ferreira dos Santos	33
8	Eutanásia	Fátima Conceição-Silva e Celina Bessa	37
9	Pesquisa com animais silvestres	Norma Labarthe e Etelcia Moraes Molinaro	46
10	Endereços importantes		52
ANEXO	Princípios éticos para o uso de animais de laboratório (COBEA)		53

APRESENTAÇÃO

A idéia principal é que este Manual seja impresso e distribuído às Bibliotecas da FIOCRUZ, bem como aos Laboratórios das Unidades da FIOCRUZ, para que seja usado como ponto de partida para o uso de animais e sempre que houver dúvida quanto a forma de executar um determinado procedimento.

Esse Manual já deveria ter sido publicado desde julho de 2007, entretanto, diversos fatores alheios à vontade da CEUA e de seus membros fizeram com que isso não tivesse sido possível.

Preocupados com o respeito que temos para com todos os funcionários que utilizam animais de laboratório em seus trabalhos e cientes da importância deste em um tempo onde as pressões contrárias ao uso de animais se faz presente no dia-a-dia dos pesquisadores, decidimos, antes de imprimi-lo em papel, disponibilizá-lo em nossa página. As críticas construtivas serão muito bem recebidas. A base do Manual está agora lançada, e sua construção será continuada a partir das idéias e necessidades dos usuários de animais.

Em breve, estaremos lançando a versão impressa, mas, a digital na página será sempre mantida, em função do dinamismo com que evoluem a ciência de animais de laboratório e a bioética.

Rio de Janeiro, 02 de maio de 2008.
Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA
Fiocruz - MS

PREFÁCIO

A idéia de escrever este Manual partiu não só da nossa observação quanto aos maiores problemas encontrados durante a avaliação dos protocolos, como também pelos questionamentos por parte dos proponentes que, nos perguntavam onde conseguir uma tabela com os anestésicos ou qual a forma de eutanásia que a CEUA/FIOCRUZ indicava.

Estamos vivendo em uma época em que alternativas ao uso de animais na experimentação científica são estudadas e onde a participação de ONGs e da sociedade é cada mais intensa na defesa dos direitos dos animais. Entretanto, temos pleno conhecimento que não é possível, ainda, substituir o uso de animais em todas as áreas. É nosso dever orientar que métodos alternativos sejam usados onde estes já se encontram validados, impedindo que animais sejam usados de forma equivocada. Entretanto, se faz mister que, nas áreas onde não existam alternativas de substituição, os preceitos de redução e refinamento sejam implementados.

Assim, sendo, sempre que for imprescindível o uso de animais, entendemos que estes devem ser tratados dentro da ética, de forma que sejam respeitados como seres vivos que estão contribuindo para o progresso da ciência. Da mesma forma que seres humanos também o fazem quando participam de um estudo clínico.

A escassez de material em português e a diversidade de informações disponíveis em fontes internacionais ou na internet fizeram com que procurássemos reunir neste Manual os pontos mais críticos que norteariam não só o preenchimento do formulário da CEUA, mas, também, os trabalhos na FIOCRUZ. Temos consciência de que esses dados representam a “média” e não um valor absoluto, pois muitos dos parâmetros dependem da idade, estado nutricional, interação de medicamentos e situações experimentais da cada animal, entre outros fatores. Dessa forma, é importante que condições diferentes sejam claramente justificadas.

Da mesma forma, estamos cientes de que esse processo é dinâmico e, sempre que houver atualizações, estas estarão disponíveis na página da CEUA até que uma nova revisão do Manual seja publicada. Portanto, quando for necessário, deve-se verificar as possíveis atualizações *on line* deste manual.

Agradeço a todos os profissionais que já foram membros da CEUA/FIOCRUZ ao longo de sua existência e que ajudaram a construir a forma com que trabalhamos hoje e que, sem dúvida, ainda está sendo estruturada, talvez muito longe ainda da perfeição.

Não posso deixar de agradecer, também, o esforço de todos os membros atuais que, direta ou indiretamente, participaram deste Manual através da redação dos capítulos, revisão dos mesmos, ou da participação em reuniões onde discutíamos quais os assuntos a serem abordados ou a melhor forma de fazê-lo. Quero agradecer, em especial, a Dra. Fátima Conceição-Silva que trouxe para si o trabalho de reunir estes textos e dar a forma final deste Manual.

Cabe ressaltar que uma Comissão de Ética não deve ser encarada como uma instância punitiva ou que deseja atrapalhar o andamento das pesquisas de uma Instituição e este trabalho ratifica uma de suas missões: *a de orientar os pesquisadores, acima de tudo.*

Maio de 2008.

*Octavio Augusto França Presgrave, M. Sc.
Coordenador da CEUA/FIOCRUZ*

BREVE HISTÓRICO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ) foi criada em 1999, através da Portaria da Presidência nº 099/99-PR, de 06/04/1999 com o objetivo de que toda e qualquer atividade que envolva o uso de animais de laboratório no âmbito da FIOCRUZ deve ser previamente submetida à análise e aprovação por esta Comissão.

A CEUA/FIOCRUZ foi criada a partir da iniciativa do Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro, na época Vice-Presidente de Pesquisa, que convidou o Dr. Marco Aurélio Martins, do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica (DFF) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), para ser o primeiro Coordenador, tendo como Vice-Coordenadora a Dra. Célia Cardoso, do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL).

Nos primeiros 6 meses de existência, a CEUA trabalhou de forma a elaborar o seu Regulamento, que foi aprovado através da Portaria da Presidência nº 242/99-PR, de 19/11/1999, ocorrendo em seguida, a publicação do Regimento Interno. Além disso, também trabalhou em uma forma de apresentação dos projetos, primeiramente em um formulário escrito em MS-Word® e logo em seguida, foi desenvolvido um programa através do qual se faz o *download* do formulário diretamente da *home page*.

A criação da CEUA/FIOCRUZ foi ao encontro da tendência mundial de se regulamentar o uso de animais de laboratório e se antecipou à obrigatoriedade de que toda instituição de pesquisa brasileira tenha uma Comissão de Ética, conforme preconizado no Projeto de Lei nº 1153/95, ainda em tramitação no Congresso Nacional. É importante ressaltar que a função da Comissão de Ética não é punitiva, mas sim, educativa.

A CEUA/FIOCRUZ teve como seu segundo Coordenador o Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto, também do DFF/IOC. Em seguida, assumiu a coordenação de Octavio Augusto França Presgrave MSc, do Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

Atualmente, a CEUA/FIOCRUZ é composta por 15 membros, de diferentes formações profissionais e de várias áreas de atuação.

PROCEDIMENTOS PARA APRESENTAÇÃO DE PROTOCOLO À CEUA/FIOCRUZ

Os primeiros protocolos apresentados necessitaram de uma aprendizagem, tanto por parte dos proponentes para o preenchimento, quanto dos membros da CEUA para avaliar o projeto. À medida que se foi tendo prática e, com o advento do segundo formulário, os trabalhos foram ficando mais facilitados.

Cabe ressaltar que o protocolo apresentado à CEUA/FIOCRUZ constitui um documento que, embora sigiloso, poderá ser solicitado pelo Ministério Público a qualquer momento, em função de denúncias de maus tratos aos animais, como já ocorreu. Dessa forma, há de se entender que o preenchimento completo e detalhado do mesmo representa um instrumento de defesa da Instituição e do próprio pesquisador, este último, responsável integral pelo que consta no protocolo e pela sua fiel execução.

Diante do exposto, a CEUA/FIOCRUZ tem procurado seguir regras internacionais, de modo a garantir que os aspectos éticos que envolvem cada experimento estejam preservados. Esse fato, na realidade, proporcionou uma demora na liberação de licenças, diante da necessidade de diversas análises das exigências feitas aos proponentes, até que o protocolo estivesse preenchido a contento.

Essa demora acabou sendo alvo de críticas ao trabalho da CEUA/FIOCRUZ. Assim sendo, a partir de janeiro de 2007 a Comissão resolveu alterar sua maneira de trabalhar, visando agilizar o processo e evitar que as licenças demorem a ser expedidas.

Seguem os procedimentos, trâmites e comentários das fases de apresentação de um protocolo:

1 - preencher o formulário de apresentação e encaminhar à Secretaria da CEUA/FIOCRUZ, uma cópia impressa e o arquivo gerado pelo *software*, em disquete – ao entregar o material, a Secretaria da CEUA/FIOCRUZ emitirá, imediatamente, o recibo de entrega ao proponente. Mais adiante, serão feitos comentários sobre os pontos críticos no preenchimento do formulário;

2 – recebido o projeto, a Coordenação irá encaminhá-lo para um membro, que atuará como relator. Em alguns casos, poderá haver 2 (dois) relatores. No caso do relator ou da própria CEUA/FIOCRUZ quando da discussão do projeto, sentir a necessidade da avaliação de um especialista na área, o projeto será encaminhado para um consultor *ad hoc*, que emitirá um parecer para subsidiar a relatoria e/ou a decisão pelo Colegiado. Esse consultor poderá ser da própria FIOCRUZ ou externo;

Observação: tanto os membros da CEUA/FIOCRUZ, quanto os consultores *ad hoc* assinam um Termo de Compromisso e um Termo de Conflito de Interesses, de forma que, ao não cumprirem o teor destes mesmos, estarão sujeitos às sanções previstas em Lei.

3 – Na reunião o relator expõe suas observações e as do consultor *ad hoc*, se for o caso. Todos os membros têm acesso ao protocolo e contribuem para o parecer do relator.

4 – O protocolo pode ser enquadrado em uma das categorias abaixo:

a) inadequado para análise – quando faltam dados que permitam o perfeito entendimento do projeto. Um exemplo pode ser a falta de detalhamento do Plano de Trabalho, que não permite a compreensão das etapas do projeto;

b) com pendência – quando faltam dados que interferem no conteúdo ético, mas que não impedem o entendimento do projeto como um todo. Exemplo: não consta o calibre da agulha, não é informada qual a via de sangria, não é citada a condição de anestesia etc;

c) aprovado – quando o conteúdo cumpre com os preceitos éticos internacionais;

d) reprovado – quando não cumpre com os preceitos éticos, quer seja por relevância científica que caracterize a necessidade do uso de animais, ou por não cumprimento de pendências.

5 – No caso de existência de pendências, o protocolo retorna ao proponente que deverá responder PONTO-A-PONTO, além de fazer as alterações no corpo do protocolo. Cabe ressaltar que no caso de discordância, o proponente deverá apontar os motivos e subsidiar a CEUA com referências, que serão anexadas ao processo e que servirão como justificativa para sustentação do caráter ético do projeto. O proponente deverá enviar as respostas das pendências em até 30 dias, caso contrário o projeto será automaticamente arquivado, sendo recebido novo número quando da sua apresentação e seguindo todos os trâmites normais.

6- Caso um protocolo seja reprovado, este poderá ser reapresentado, com as modificações sugeridas, passando por todo o trâmite de um protocolo novo.

NOTAS IMPORTANTES SOBRE O PREENCHIMENTO DO FORMULÁRIO CEUA.

Com base nas dúvidas mais frequentes ao preencher o protocolo, seguem algumas indicações de pontos que devem ser observados durante o preenchimento. É preciso sempre ter em mente que o protocolo é um documento legal, e como tal, deve conter todas as informações relevantes para a compreensão dos detalhes de sua execução.

Como no Brasil ainda não dispomos de licenciamento individual para os pesquisadores, o protocolo CEUA-Fiocruz, além de licenciar o projeto, habilita os membros da equipe a executarem as atividades a eles atribuídas e definidas no protocolo.

DÚVIDAS MAIS FREQUENTES:

- 1- Os animais para uso em experimentação são classificados em:
 - a- Animais convencionais- camundongos, ratos, coelhos, cobaias e hamsters
 - b- Animais não convencionais - qualquer animal que não pertença ao item (a) como cães, gatos, aves, peixes, primatas não humanos, animais silvestres de qualquer espécie etc.
- 2- Os animais não convencionais seguem regras específicas restritivas quanto ao procedimento e quantidades permitidas para a experimentação;
- 3- Se o projeto solicitar o uso de animais não convencionais torna-se obrigatório o preenchimento do anexo “utilização de animais não convencionais” existente no final do formulário CEUA, assim como a apresentação de qualquer licença, documento etc., na dependência do animal indicado;
- 4- Animais não convencionais silvestres requerem a licença do IBAMA, além da licença da CEUA para que sejam utilizados em experimentação; uma licença não exclui a outra;
- 5- Para a utilização de animais geneticamente modificados, mesmo que convencionais, o pesquisador responsável deve possuir a licença do tipo CQB. A CEUA não poderá licenciar projetos utilizando OGM sem a apresentação do CQB. A existência de uma das licenças não exclui a necessidade da outra;
- 6- Animais aprovados para um protocolo não poderão ser usados em outro protocolo. Também é preciso lembrar que é vedada a reutilização de animais convencionais no protocolo original ou em novo protocolo; casos particulares devem ser apresentados à CEUA para verificação das condições éticas da solicitação que serão verificadas caso- a- caso; Animais não convencionais a princípio também não podem ser

reutilizados. No entanto, isto poderá ocorrer em condições especialíssimas. As solicitações serão estudadas caso a caso;

- 7- Em todos os protocolos devem estar claros e indicados:
 - a- O tipo (espécie, sexo, idade etc.) e o número de animais solicitados no total, especificando a necessidade de seu emprego;
 - b- No caso de animais convencionais esta solicitação será dividida pelo tempo de experimentação, cabendo ao solicitante especificar quantos, de que tipo e o cronograma de utilização temporal;
 - c- Solicitação de animais não convencionais só será aceita com "número totais de animais", não importando o tempo de experimentação, mantendo-se a necessidade de especificação e indicação da necessidade;
- 8- No item “membros da equipe” devem ser fornecidos todos os detalhes que permitam a verificação da capacitação pessoal para a manipulação dos animais, e não apenas títulos e diplomas;
- 9- No item “base teórica” deve ser indicado todo o conhecimento prévio existente no assunto a ser abordado que indiquem: o estado atual do conhecimento (teoria), a propriedade da solicitação (justificativa) e os objetivos a serem alcançados; no item “plano de trabalho” deve estar especificado de forma clara todas as etapas do protocolo e da manipulação animal assim como o tempo de utilização, e se for o caso as formas de manutenção (condições de biotério), captura, soltura e eutanásia. Devem também constar o número total de animais e a necessidade de repetições, quando bem embasadas. Solicita-se ainda organizar um desenho esquemático do protocolo indicando quando e como os animais serão utilizados de forma a facilitar a verificação da manipulação completa do animal durante a fase experimental.
- 10- A justificativa e o objetivo devem estar bem claros. Cabe ressaltar que a relevância científica do projeto está diretamente ligada aos aspectos éticos (uso desnecessário de animais), sendo, portanto avaliada durante o trâmite do projeto. Por exemplo, a repetição de experimento que seja consagrado na literatura sem justificativa plausível, fere a ética, uma vez que não acrescenta nenhuma contribuição ao conhecimento científico;
- 11- O “plano de trabalho” deve retratar as etapas do experimento, quantos e quais grupos recebem imunizações tratamentos, desafios etc. (por exemplo: “os animais são divididos em 4 grupos de 10 animais sendo que o grupo 1 recebe solução salina, grupo 2 tratamento na concentração de 1mg/Kg, grupo 3 tratamento na concentração de 2mg/Kg e grupo 4 recebe o veículo de diluição do fármaco. Os grupos serão tratados por VO por 5 dias. No quinto dia será coletado sangue de 5 animais de cada grupo etc.). O plano pode ser apresentado como texto, tabela, organograma etc., desde que permita uma visualização do protocolo como um todo e do real número de animais usados;

- 12- Na descrição dos procedimentos, detalhar todos os pontos (mesmo que já tenham sido mencionados no plano de trabalho). Informe dose, concentração, via de inóculos, calibre de agulhas, volume de sangue a ser coletado, intervalo entre as coletas, via, forma de imobilização, tempo de imobilização etc.;
- 13- A CEUA lembra que o importante é o fluxo de manipulação (exemplo animal anestesiado, inoculado, sangrado semanalmente, submetidos à eutanásia após 2 meses de experimentação). Assim, mesmo que todos os procedimentos sejam simples, a manipulação continuada e longa precisa ser avaliada, daí a necessidade do esquema de manipulação.
- 14- Os protocolos experimentais a serem realizados com o material biológico precisam ser indicados para a verificação da capacidade de obtenção dos resultados esperados. No entanto, não há necessidade de detalhamento (exemplo: informar a realização de resposta proliferativa e dosagem de citocinas por ELISA, mas sem dar detalhes dos protocolos a serem utilizados);
- 15- A CEUA solicita que, sempre que possível, as manipulações dos animais sejam organizadas em relação à manipulação animal e não ao protocolo em si e que isto se reflita no “índice e detalhamento dos procedimentos” solicitado no formulário CEUA. Por exemplo, se determinado grupo de camundongos vai ser imunizado, depois desafiado e observado por quatro semanas para verificação de resposta imune (coleta de sangue e baço em grupos semanais), seguida de eutanásia ao final, este pode ser considerado um único procedimento, já que o mesmo animal estará sendo manipulado em todas estas fases. Evitar transformar este exemplo em 4 procedimentos (imunização, desafio, coleta, eutanásia). Se por questões práticas não for possível, indicar no local apropriado que os animais de um procedimento estão sendo utilizados em outros procedimentos. Isto evita problemas na verificação do número de animais necessários para o protocolo;
- 16- No caso de haver qualquer possibilidade de efeito adverso (exemplo: hematomas, toxicidade, dor, alterações de comportamento) eles devem ser indicados de forma explícita, mesmo que raros ou improváveis. Deve-se ter em mente os efeitos causados pelo procedimento ou pelo experimento em si;
- 17- Todo procedimento que envolver cirurgia ou quando forem utilizados animais não convencionais deve ter um veterinário responsável inscrito no CRMV do local onde os experimentos serão realizados (Rio de Janeiro; Minas Gerais; Bahia etc.);
- 18- Nenhuma das partes do protocolo deve ser deixada em branco. Quando não couber resposta mencionar “não se aplica”;
- 19- Sempre mencionar, quando aplicável, o desfecho (*end-point*) a ser utilizado para evitar o sofrimento animal. Neste caso, descrever quais parâmetros serão indicativos de desfecho (exemplo: perda de peso superior a 20%, hiporresponsividade).

20- A CEUA-Fiocruz estimula os pesquisadores a manter um programa de enriquecimento ambiental, tanto na criação quanto na experimentação animal.

21- É preciso lembrar que as normas para o uso de animais em experimentação são dinâmicas e, sempre que houver atualizações, estas estarão disponíveis na página da CEUA até que uma nova revisão do Manual seja publicada. Portanto, quando for necessário, deve-se verificar as possíveis atualizações *on line* deste manual.

PRINCIPAIS VIAS E FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO/INOCULAÇÃO EM ANIMAIS CONVENCIONAIS

Neste capítulo estão apresentadas de forma resumida em tabelas as principais vias de administração / inoculação usadas na administração de fármacos, imunógenos e também na infecção de animais convencionais (ratos, camundongos, cobaias, hamster e coelhos). Também poderá ser encontrado o volume máximo a agulha apropriada para cada manipulação.

Cada tabela está dividida de acordo com a via, a saber: subcutânea (SC), intramuscular (IM), intraperitoneal (IP) e endovenosa (IV). As drogas administradas por via oral (VO) devem ser adicionadas junto à ração ou na água. Já a administração orogástrica (gavagem) exige a introdução da droga por tubo metálico ou cânula plástica (com protetor nas bordas para evitar ferimentos no animal) ligado à seringa. O tamanho da cânula, as condições de pH, viscosidade e volume específicos de cada droga devem ser adequadas para cada animal. Os procedimentos de gavagem serão analisados caso- a- caso. Para tal, todos os detalhes da administração (tipo, volume, frequência, forma de contenção etc.), devem ser informados no detalhamento do procedimento solicitado no formulário CEUA.

Casos não contemplados neste manual devem ser verificados nos “guidelines” internacionais cujos endereços se encontram no final deste manual.

Lembre-se que os volumes indicados são os máximos permitidos para o animal adulto. A utilização de animais jovens ou recém - natos requererá a adaptação de via / dose em cada situação.

VIAS, VOLUMES E LOCAIS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS INJETÁVEIS EM RATOS.

	Subcutânea (SC)	Intramuscular (IM)	Intraperitoneal (IP)	Intravenosa (IV)
Local	Região nugal e dorsal	Quadríceps face posterior da coxa	Quadrante lateral inferior direito	Dorsal do pênis, lateral da cauda e safena
Volume máximo	4mL/Kg	1.25mL/Kg	5-10mL/Kg	1mL/Kg
Agulha	13x4.5 ou 25x5	20x5.5 ou 25x6	25x6 ou 20x5.5	25x5

Fonte: adaptado de Fantoni e Cortopassi, 1996; Waynforth e Flecknell, 1998; Harkness e Wagner 1993; Rasmussen e Ritskes-Hoitinga, 1999.

VIAS, VOLUMES E LOCAIS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS INJETÁVEIS EM CAMUNDONGOS.

	Subcutânea (SC)	Intramuscular (IM)	Intraperitoneal (IP)	Intravenosa (IV)
Local	Região nugal, Dorsal e base da calda	Quadríceps; face posterior da coxa	Quadrante lateral inferior direito	lateral da calda, femural e retrorbital*
Volume máximo	0.5mL/animal	0.2mL/animal	1mL/animal	0.2mL/animal
Agulha	13x4.5 ou 25x5	13x4.5 ou 25x5	13x4.5 ou 25x5	20x5,5 ou 13X4,5

Fonte: adaptado de Fantoni e Cortopassi, 1996; Waynforth e Flecknell, 1998; Harkness e Wagner 1993; Rasmussen e Ritskes-Hoitinga, 1999.

* Em casos especiais utilizando drogas anestésicas

VIAS, VOLUMES E LOCAIS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS INJETÁVEIS EM COBAIAS

	Subcutânea (SC)	Intramuscular (IM)	Intraperitoneal (IP)	Intravenosa (IV)
Local	Região nugal, Dorsal e coxim plantar*	Quadríceps; face posterior da coxa	Quadrante lateral inferior direito	Safena e Cefálica
Volume máximo	4mL/Kg	1.25mL/Kg	5-10mL/Kg	0.5mL
Agulha	25x5 ou 25x7	20x5.5 ou 25x 6	20x5.5 ou 25x 6	13x4 ou 25x 5

Fonte: adaptado de Fantoni e Cortopassi, 1996; Waynforth e Flecknell, 1998; Harkness e Wagner 1993; Rasmussen e Ritskes-Hoitinga, 1999.

*Volume máximo de 0.1mL

VIAS, VOLUMES E LOCAIS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS INJETÁVEIS EM HAMSTERS.

	Subcutânea (SC)	Intramuscular (IM)	Intraperitoneal (IP)
Local	Região nugal e dorsal	Quadríceps; face posterior da coxa	Quadrante lateral inferior direito
Volume máximo	1mL/animal	0.2mL/animal	4mL/animal
Agulha	25x5	25x5	25x5 ou 25x7

Fonte: adaptado de Fantoni e Cortopassi, 1996; Waynforth e Flecknell, 1998; Harkness e Wagner 1993; Rasmussen e Ritskes-Hoitinga, 1999.

VIAS, VOLUMES E LOCAIS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS INJETÁVEIS EM COELHOS.

	Subcutânea (SC)	Intramuscular (IM)	Intraperitoneal (IP)	Intravenosa (IV)
Local	Região nugal e flanco/dorso	Quadríceps; face posterior da coxa	Quadrante lateral inferior direito	Marginal da orelha*
Volume máximo	5mL/animal	2mL/animal	50mL/animal	10mL/Kg
Agulha	25x6 ou 25x7	25x6 ou 25x7	25x6 ou 25x7	25x7, 27x8 ou dispositivo intravenoso 24G

Fonte: adaptado de Fantoni e Cortopassi, 1996; Waynforth e Flecknell, 1998; Harkness e Wagner 1993; Rasmussen e Ritskes-Hoitinga, 1999.

* esta via deve ser usada para pequenos volumes. Se volumes maiores forem necessários pode-se usar a veia femoral. No entanto, tanto uma quanto outra requerem pessoal treinado, pois os acidentes são fáceis de acontecer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FANTONI, D. T; CORTOPASSI, S. R. G. Técnicas anestésicas em animais de laboratório. in: Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. São Paulo: EPM 1996.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. Biologia e Clínica de coelhos e roedores. 3. ed. São Paulo: ROCA, 1993.

RASMUSSEN, C; RITSKES-HOTINGA, M. 1999. An alternative method for rat fixation when giving subcutaneous, intramuscular and intraperitoneal infection (Camilla's method). Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science, 26 (3):156-159.

WAYNFORTH, H. B; FLECKNELL, P. A. Experimental and surgical technique in the rat. 2. ed. London: Academic Press, 1998.

FÁRMACOS USADOS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO ANESTÉSICOS E ANALGÉSICOS

CONSIDERAÇÕES GERAIS:

Nestas últimas décadas, a anestesia veterinária evoluiu bastante, e com o aumento da preocupação com o bem - estar dos animais, a necessidade do controle da dor também aumentou. Um dos últimos conceitos utilizados na anestesia veterinária é denominado anestesia balanceada, que se refere à utilização de diferentes fármacos associados, com intuito de conseguirmos as propriedades da anestesia (inconsciência, imobilização, analgesia, abolição dos reflexos autonômicos e relaxamento muscular) com mínimos efeitos colaterais, principalmente nos sistemas respiratório e cardiovascular (Ex: associar tiopental + opióide + relaxante muscular).

Com relação à analgesia, o que temos de mais moderno é a aplicação da técnica de analgesia multimodal, que é a utilização de diferentes fármacos analgésicos (Ex: AINEs + opióides) e diferentes técnicas (bloqueios regionais + anestesia geral) com a finalidade de melhorarmos a analgesia do animal com mínimos efeitos colaterais e melhor conforto no pós-operatório.

Para utilizarmos as técnicas de anestesia balanceada e analgesia multimodal é essencial conhecermos a farmacologia das drogas necessárias.

Em seguida estão expostas algumas propriedades dos principais fármacos utilizados em ambas as técnicas.

- Diazepam e midazolam (benzodiazepínicos) são sedativos e associados a anestésicos gerais (Ex: tiopental, propofol, etomidato e quetamina) aumentam o tempo de anestesia. Vantagem: Possuem mínimos efeitos cardiovasculares e respiratórios nas doses indicadas

- Tiopental, propofol e etomidato (anestésicos gerais injetáveis) são utilizados para induzir e manter a anestesia geral. Não possuem ação analgésica logo devem ser utilizados associados com um analgésico (Ex: opióide, $\alpha 2$ agonista, etc). O propofol é indicado em animais com problema de metabolização (Ex: hepatopatia) e o etomidato é indicado em animais com cardiopatias.
- Halotano e isoflurano (anestésicos gerais inalatórios) são utilizados para induzir e manter a anestesia geral. Estes fármacos podem ser administrados via máscara facial ou via traqueotubo apropriados para a espécie. A grande vantagem destes anestésicos gerais é que permitem a adequação do plano cirúrgico com rapidez, porém a grande desvantagem nestas espécies é que necessita de um profissional atento para que não ocorra o aprofundamento drástico da anestesia. Em animais idosos é mais indicada a utilização do isoflurano.
- Quetamina e tiletamina (anestésicos dissociativos) são anestésicos gerais, porém possuem ação analgésica somática (pele e músculo). Possuem como grande vantagem a versatilidade de utilizarmos em diferentes vias de administração.
- Aspirina, piroxicam, flunixin, ibuprofeno, fenilbutazona (AINEs) e cetoprofeno são antiinflamatórios não esteróides que possuem como principal efeito a ação analgésica. Importante no controle da dor pós-operatória e para evitar o fenômeno conhecido como hipersensibilização periférica, que é devido à lesão tecidual e à liberação de várias substâncias inclusive as prostaglandinas. Este fenômeno promove a maior dificuldade no controle da dor.
- Morfina, meperidina, metadona (opióides) e cloridrato de tramadol são potentes analgésicos, sendo indicados em procedimentos mais dolorosos (Ex: Lesão em uma grande área do corpo do animal, cirurgias ortopédicas, mastectomia radical etc.). São bastante úteis em evitar alterações no sistema nervoso central (corno dorsal da medula) que promovem a hiperalgesia, alodinia e hiperpatia.
- Xilazina e medetomidina ($\alpha 2$ agonistas) são potentes analgésicos que devem ser usados em cirurgias mais dolorosas. Associados aos opióides conferem uma ótima analgesia para o animal.

Obs.: O tempo de ação destes fármacos vai depender grande parte da dose utilizada, logo para elaborar um protocolo adequado para determinado experimento, é essencial sabermos o tempo de duração e o grau de dor do procedimento realizado em determinada espécie. **As doses fornecidas nas tabelas servem como referência, mas não devem ser simplesmente aumentadas visando um tempo maior de anestesia. Nestes casos é imprescindível a presença de um veterinário.** Com estas informações é possível montar um protocolo anestésico e analgésico para determinado experimento, porém sendo de suma importância a execução do estudo piloto para adequarmos estas doses, se necessário. Para avaliarmos o protocolo analgésico é necessário conhecermos a espécie que estamos trabalhando e como podemos avaliar a dor nesta espécie, pois nestes últimos anos houve grande evolução nos métodos de avaliação de dor nos animais.

ANESTÉSICOS E TRANQUILIZANTES UTILIZADOS EM CAMUNDONGOS

Fármaco	Dose	Via de administração	Duração de anestesia
Tiopental	25-50 mg.kg ⁻¹ 50 mg.kg ⁻¹	IV IP	10 min
Quetamina	80-100 mg.kg ⁻¹ 100 mg.kg ⁻¹ 50 mg.kg ⁻¹	IM IP IV	
Quetamina + Diazepam	200 mg.kg ⁻¹ 5 mg.kg ⁻¹	IM IP	
Quetamina + Xilazina	100-200 mg.kg ⁻¹ 5-16 mg.kg ⁻¹	IM IP	60 – 100 min
Tiletamina + Zolazepam (Zoletil)	80-100 mg.kg ⁻¹ (contenção)	IP	
Etomidato	23.7-33.0 mg.kg ⁻¹ 11.2 mg.kg ⁻¹	IP IV	20 min 20 min
Propofol	12-26 mg.kg ⁻¹	IV	5.6-6.9 min
Halotano	Sob consulta	Sob consulta	Sob consulta
Isoflurano	Sob consulta	Sob consulta	Sob consulta

ANALGÉSICOS UTILIZADOS EM CAMUNDONGOS

Analgésico	Dose, via e duração
Aspirina (AINEs)	20 mg.kg ⁻¹ , SC,
Ibuprofeno (AINEs)	7.5 mg.kg ⁻¹ , Oral,
Piroxicam (AINEs)	3.4-20 mg.kg ⁻¹ , Oral
Fenilbutazona (AINEs)	31-250 mg.kg ⁻¹ , IP
Buprenorfina (opióide)	2.5 mg.kg ⁻¹ , IP, SC, 6-12 horas
Butorfanol (opióide)	0.05-5.4 mg.kg ⁻¹ , SC, 2-4 horas
Meperidina (opióide)	3-12 mg.kg ⁻¹ , IP, SC, 2-3 horas

ANESTÉSICOS E TRANQUILIZANTES UTILIZADOS EM RATOS

Fármaco	Dose	Via de administração	Duração de anestesia
Diazepam	5.0-15 mg.kg ⁻¹ (sedação)	SC	Sedação
Tiopental	20-40 mg.kg ⁻¹ 40 mg.kg ⁻¹	IV IP	5-10 min
Quetamina	50-100 mg.kg ⁻¹	IM	
Quetamina + Diazepam	45-60 mg.kg ⁻¹ 5-10 mg.kg ⁻¹ ou 2,5 mg.kg ⁻¹	IP IP IM	
Quetamina + Medetomidina	60-75 mg.kg ⁻¹ 0.25-0.5 mg.kg ⁻¹	IP SC	
Quetamina + Xilazina	40-87 mg.kg ⁻¹ 5-13 mg.kg ⁻¹	IP, IM IP, IM	
Tiletamina + Zolazepam (Zoletil)	20 mg.kg ⁻¹	IM	
Propofol	7.5-10.0 mg.kg ⁻¹ 44-45 mg.kg.hora ⁻¹	IV bolus IV Infusão contínua	8-11 min
Halotano	Sob consulta	Sob consulta	Sob consulta
Isoflurano	Sob consulta	Sob consulta	Sob consulta

ANALGÉSICOS UTILIZADOS EM RATOS

Analgésico	Dose, via e duração
Aspirina (AINEs)	20 mg.kg ⁻¹ , SC,
Buprenorfina (opióide)	0.25-1.6 mg.kg ⁻¹ , IP, 6-12 horas
Butorfanol (opióide)	0.04-23.3 mg.kg ⁻¹ , SC, 2-4 horas
Meperidina (opióide)	3-12 mg.kg ⁻¹ , IP, SC, 2-3 horas
Xilazina (α2 agonista)	5-12 mg.kg ⁻¹ , SC, 2 horas

ANESTÉSICOS E TRANQUILIZANTES UTILIZADOS EM COBAIAS

Fármaco	Dose	Via de administração	Duração de anestesia
Diazepam	2.5-5.0 mg.kg ⁻¹	IP	Sedação
Xilazina	5-40 mg.kg ⁻¹	IP	Sedação média
Quetamina	40-200 mg.kg ⁻¹	IM	variável
Quetamina + Diazepam	60-100 mg.kg ⁻¹ 5-8 mg.kg ⁻¹	IM IM	variável
Quetamina + Medetomidina	40 mg.kg ⁻¹ 0.5 mg.kg ⁻¹	IM ou IP SC	variável
Quetamina + Xilazina	30-44 mg.kg ⁻¹ 0.1-5.0 mg.kg ⁻¹	IM IM	77 min
Tiletamina + Zolazepam (Zoletil)	10-80 mg.kg ⁻¹	IM ou IP	variável
Halotano	Sob consulta	Sob consulta	Sob consulta
Isoflurano	Sob consulta	Sob consulta	Sob consulta

ANALGÉSICOS UTILIZADOS EM COBAIAS

Analgésico	Dose, via e duração
Aspirina (AINEs)	20 mg.kg ⁻¹ , SC,
Buprenorfina (opioíde)	0.5-0,8 mg.kg ⁻¹ , SC, 6-12 horas
Morfina (opioíde)	5-12 mg.kg ⁻¹ , SC, IM, 2-4 horas
Meperidina (opioíde)	20 mg.kg ⁻¹ , IM, SC, 2-3 horas
Metadona (opioíde)	3.6 mg.kg ⁻¹ , SC

ANESTÉSICOS E TRANQUÍLIZANTES UTILIZADOS EM COELHOS

Fármaco	Dose	Via de administração	Duração de anestesia
Diazepam	5.0-10.0 mg.kg ⁻¹ 1-2 mg.kg ⁻¹	IM IM, IV	Sedação
Midazolam	2 mg.kg ⁻¹	IP, IV	Sedação
Xilazina	3-9 mg.kg ⁻¹	IM, IV	Sedação
Medetomidina	0.25 mg.kg ⁻¹	IM	Sedação
Tiopental	15-30 mg.kg ⁻¹	IV	variável
Quetamina	20-60 mg.kg ⁻¹	IM	variável
Quetamina + Diazepam	60-80 mg.kg ⁻¹ 5-10 mg.kg ⁻¹	IM IM (administrado 30 min antes da quetamina)	variável
Quetamina + Medetomidina	25 mg.kg ⁻¹ 0.5 mg.kg ⁻¹	IM SC	variável
Quetamina + Xilazina	10 mg.kg ⁻¹ 3 mg.kg ⁻¹	IV IV	77 min
Quetamina + Xilazina	22-50 mg.kg ⁻¹ 2.5-10 mg.kg ⁻¹	IM IM	variável
Tiletamina + Zolazepam (Zoletil)	32-64 mg.kg ⁻¹	IM	variável
Propofol	7.5-15 mg.kg ⁻¹	IV	variável
Halotano	Sob consulta	Sob consulta	Sob consulta
Isoflurano	Sob consulta	Sob consulta	Sob consulta

ANALGÉSICOS UTILIZADOS EM COELHOS

Analgésico	Dose, via e duração
Morfina (opioíde)	2.5 mg.kg ⁻¹ , SC, 2-4 horas
Meperidina (opioíde)	5-10 mg.kg ⁻¹ , SC, 2-3 horas
Butorfanol (opioíde)	0.1-0.5 mg.kg ⁻¹ IV, 4 horas
Buprenorfina (opioíde)	0.01-0.05 mg.kg ⁻¹ , SC, 6-12 horas
Flunixin meglumine (AINEs)	1.1 mg.kg ⁻¹ , IM, 12 horas
Piroxicam (AINEs)	0.2 mg.kg ⁻¹ , Oral, 8 horas

ANESTESIA COMPOSTA PARA:

1- COELHOS

Acepromazina 1% - 0,1mL / Kg / IM

Xilazina – 0,2mL / Kg / IM

Cloridrato de Ketamina 50% - 0,5mL / Kg / IM

Peso Animal (Kg)	Acepran 1% (mL)	Xilazina (mL)	Ketamina (mL)
1	0,1	0,2	0,5
2	0,2	0,4	1,0
2,5	0,25	0,5	1,25
3,0	0,3	0,6	1,5
3,5	0,35	0,7	1,75
4,0	0,4	0,8	2,0
4,5	0,45	0,9	2,25
4,5	0,5	1,0	2,5

2- COBAIA Usar dobro da dose de coelho.

3- RATO E CAMUNDONGO

Tiopental 1g – diluir 5% (20mL em 1g) – 0,6mL / 100g para sangria (Para manter o animal vivo usar 0,18mL / 100g)

CMDG 30g – 0,2 mL intraperitoneal

Rato 400g – 2,4 mL intraperitoneal

Ketamina 50% - Xilazina 2% (mistura em partes iguais) – 0,1 a 0,2 mL / 100g, caso precise prolongar, administrar metade da dose.

CMDG 30g – 0,03 mL intramuscular (dose mínima)

Rato 400g – 0,4 mL intramuscular (dose mínima)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FLECKNELL, P. A. The relief of pain in laboratory animals. *Laboratory Animal*, 18: 147, 1984.

FLECKNELL, P. A.; LILES, J. H. Assessment of analgesic action of opioid agonist-antagonists in the rabbit. *J. Assoc Veterinary Anaesthesia*, 17: 24, 1990.

THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W. J.; BENSON, J. G. *Veterinary Anesthesia: Anesthesia of wild, exotic, and laboratory animals*, Baltimore, Williams & Wilkins, 1996. 686-735 p.

RECOMENDAÇÕES PARA A PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

As etapas críticas na produção de anticorpos são:

- 1-preparo de antígeno
- 2-seleção da espécie animal (idade inclusive)
- 3-seleção e preparo de adjuvante
- 4-protocolo de imunização
- 5- seguimento pós-injeção
- 6- coleta dos anticorpos

ANTÍGENOS

- Deve ser o mais purificado possível contendo apenas os epítomos desejados, para produzir anticorpos de maior especificidade.
- Deve ser livre de toxicidade para o animal (lipopolissacárides e resíduos químicos)
- Possuir pH fisiológico, estar estéril.
- Estar nas concentrações adequadas para não induzir tolerância ou outro tipo de modulação não desejada. Segundo alguns autores, a dose usual para uma proteína solúvel administrada com adjuvante de Freund completo, depende da espécie animal: assim no caso de coelhos: 50-1000 µg; camundongos: 10- 200 µg; cabras e ovelhas 250 a 5000 µg

ESPÉCIE ANIMAL

Convêm considerar o volume de anticorpo que se pretende produzir; a distância filogenética entre o animal imunizado e o antígeno, assim como a idade do animal (devem ser adultos jovens) Vide tabela 1.

Tabela 1 - Idades mais adequadas dos animais para imunização

Espécie animal	idade
Camundongo	6 semanas
Ratos	6 semanas
Coelhos	3 meses
Cobaias	3 meses
Galinhas	18-20 semanas
Cabras	6-7 meses
Ovelhas	7-9 meses

ADJUVANTES

No início da imunização, escolher o adjuvante adequado pode ser difícil. O adjuvante completo de Freund (ACF), composto de uma emulsão de água em óleo adicionada de *Mycobacterium* sp, deve ser evitado. O imunógeno deve ser preparado como emulsão que consiste de volumes iguais de adjuvante e antígeno (uma parte de ACF ou menos, e uma parte de Antígeno). Caso seja necessário, deve ser utilizado apenas na primeira imunização e o adjuvante incompleto de Freund (AIF) nas imunizações subsequentes. Pode ser utilizado somente quando pequenas quantidades de imunógeno solúvel estão disponíveis. Se houver disponibilidade de grande quantidade de imunógeno particulado ou altamente imunogênico, outros adjuvantes como TiterMax, Ribí, Lipovant, adjuvax, alhydrogel devem ser considerados.

Um aspecto importante nos procedimentos de imunização é a utilização de uma equipe técnica competente, treinada e experiente na contenção das espécies animais sendo usadas assim como na realização das imunizações. Devem conhecer e reconhecer sinais de sofrimento nos animais injetados e estar capacitados para agir quando necessário.

O Adjuvante de Freund completo pode ser utilizado para inoculações por via intramuscular, subcutânea ou intradérmica. **Jamais** deve ser inoculado endovenosamente ou em doses repetidas. Não pode ser utilizado em cavalos.

Este adjuvante produz reações inflamatórias agudas e crônicas, abscessos estéreis e /ou necrose ulcerativa no ponto de inoculação. **Para limitar a severidade da inflamação é aconselhável:**

- a) **limitar a concentração de *Mycobacterium* para 0,05 a 0,1 mg`/ mL.**
- b) **adicionar antígeno concentrado ao adjuvante e deste modo reduzir o volume da emulsão a ser inoculado.**
- c) **Utilizar vários pontos de inoculação afastados entre eles, com limite de volume por ponto e o número de pontos não deve exceder a 10.**
- d) **manter a esterilidade da solução antigênica.**

O adjuvante de Freund incompleto, por não conter micobactérias, produz reação inflamatória, porém de intensidade menor e de duração mais curta. Considera-se menos potente, embora seja adequado para reinoculações, estimulando a resposta humoral.

Vários adjuvantes têm sido desenvolvidos visando provocar menos lesões no animal inoculado. Entre estes, os que são uma suspensão de óleo em água e utilizam óleos metabolizáveis na sua composição além de algum surfactante não iônico que ativa o sistema complemento, se ligando a seus componentes facilitando assim o contato do antígeno com as células dendríticas foliculares (TiterMax) Outros, são misturas de óleo metabolizável, detergente e imunoestimuladores Como imunoestimuladores, utilizam-se produtos bacterianos modificados que minimizam a reação inflamatória (Adjuvante de Ribí).

Os sais hidróxido e fosfato de alumínio são misturados ao antígeno formando uma mistura aquosa. Os géis de hidróxido de alumínio além de serem livres de pirógenos e estáveis, possuem alta capacidade de ligação com proteínas a pH neutro. Alguns autores os consideram como o adjuvante para antígenos fracos, mais eficientes que o ACF; porém requer de reinoculações mais freqüentes. Nas vacinas humanas é o adjuvante de escolha.

Tabela 1- IMUNIZAÇÃO: VIAS MAIS UTILIZADAS PARA INJEÇÃO PRIMÁRIA E REINOCULAÇÕES (BOOST) Leenars 1999, Leenars et al, 2005

Vias	Observações	desvantagens
Subcutânea.	Recomendado para usar com adjuvantes oleosos para aproveitar o efeito depósito. Processos inflamatórios podem ser visualizados. Usar com e sem adjuvante. Usar em primo inoculação e "boosters" Distribua em máximo 4 pontos	Absorve lentamente
Intramuscular	Absorção rápida, especialmente na atividade muscular. Pode ser administrado em volumes grandes segundo o animal. Não pode usar com adjuvantes viscosos (ACF) em roedores. Pode usar na primo e reinoculações	Volumes grandes em espaços restritos provocam dor. Antígeno e adjuvante podem infiltrar nos planos interfasciais e danificar o nervo ciático
Intraperitoneal	Via eficiente para exposição de antígenos. Não usar adjuvantes oleosos. Não recomendada em coelhos e animais maiores	A inoculação de adjuvantes oleosos provoca peritonite. Risco de choque anafilático no "boost"
Endovenosa	Há rápida distribuição do Antígeno e pode ser metabolizado rapidamente O antígeno é enviado primeiramente para o baço e depois para os linfonodos	Risco de choque anafilático no "boost". Antígenos insolúveis, adjuvantes viscosos ou oleosos não podem ser usados sob risco de embolia.
Intradérmica	Há processamento eficiente do antígeno devido à abundância de células de Langerhans Pequenas quantidades de antígeno são suficientes. Recomendada só para animais maiores (coelhos, cabras, cavalos).	Injeção em espaço limitado da pele provoca dor. Adjuvantes oleosos provocam processos ulcerativos.

REINOCULAÇÕES.

Estímulos antigênicos repetidos permitem a estimulação dos linfócitos de memória que produzem anticorpos de maior afinidade. Porém algumas precauções devem ser observadas:

1. As reinoculações devem ser feitas quando o teor de anticorpos circulantes tenha atingido o declínio (2-3 semanas para antígenos solúveis). Estímulos antigênicos em prazos curtos podem induzir tolerância.
2. Quando utilizar adjuvantes que formam depósito, administrar os “boost” pelo menos 4 semanas após o primeiro inóculo. Use o máximo de 2 ou 3 reinoculações.
3. Não utilizar adjuvante completo de Freund, pois podem provocar lesões teciduais severas.
4. Injeção endovenosa em animal já imune pode provocar morte do animal por choque (imunocomplexos circulantes).

ANTICORPOS MONOCLONAIS EM CAMUNDONGOS

Na produção de anticorpos monoclonais, devem ser observadas as seguintes recomendações:

- **Imunização *in vivo***: seguir os procedimentos indicados para anticorpos policlonais. Dependendo do antígeno, é possível fazer uso de imunizações repetidas com intervalos curtos, eliminando a necessidade de adjuvantes, porém deve ser considerado que pode induzir a produção de anticorpos de baixa afinidade.

- **Produção de ascites:**

"**Priming**": Utilizar máximo de 0,3 mL de adjuvante de Freund incompleto em uma só injeção. Pristane não é recomendado

Implantação de hibridomas: Injetar até 3×10^6 em 1 mL na cavidade intraperitoneal. A partir daqui o animal deve ser monitorado para evidenciar sofrimento: dificuldade respiratória, diminuição de atividade, pelo eriçado, tamanho do abdômen. O acúmulo de líquido ascítico além de produzir aumento no peso total, não deve produzir dor ou desconforto aos animais. De nenhum modo podem exceder mais que 20% do peso de um animal normal.

- **Coleta de líquido ascítico:** Para realizar a paracentese, o animal deve estar anestesiado. Podem ser realizadas no máximo duas coletas em condições assépticas com agulha 25x8 ou 25x7. O volume que pode ser retirado na primeira paracentese é de 4-5 mL e deve ser realizado em condições assépticas.

Tabela 2
VOLUME MÁXIMO (mL) A SER INOCULADO EM ANIMAIS SEGUNDO O TIPO DE ADJUVANTE UTILIZADO (adaptado de Leenaars, 2005).

Mistura antígeno+adjuvante oleoso ou viscoso			Mistura antígeno+adjuvante aquoso				
animal	s.c	i.d	s.c	i.d	i.m	i.p	i.v
Camundongo							
Volume (mL)	0.1	XX	0.5	XX	XX	1.0	0.2
Agulha	25x5		13x4,5			13x4,5	13x4,5
Ratos							
Volume (mL)	0,2	XX	0.5-1.0	XX	XX	5.0	0.5
Agulha	25x5		13x4,5			25x5	13x4,5
Cobaias							
Volume (mL)	0.2	XX	1.0	XX	XX	5.0-10	0.5-1.0
Agulha	25x5		13x4,5			25x5	13x4,5
Coelhos							
Volume (mL)	0,1-	0.025-	1.5	0.05	0.2-	10-20	1.5
Agulha	0,25 13x4,5	0.05 25x5	13x4,5	13x4,5	0.5 25x7	25x7	13x4,5
Ovelhas, cabras							
Volume (mL)	0.5	0.05 -	2.0	0.05	0.2.0	XX	30
Agulha	13x4,5	0,25 25x5	13x4,5	13x4,5	25x8		40x12
Bezerros							
Volume (mL)	0.5	0.05	2.0	0.05	2.0	XX	Não
Agulha	13x4,5	25x5	13x4,5	13x4,5	25x8		testado
Aves							
Volume (mL)	0.25	0.05	0.5	0.05	1.0	XX	0.5
Agulha	13x4,5	13x4,5	13x4,5	13x4,5	25x8		25x7

**XX não
recomendado**

Bibliografia principal

- Canadian Council on Animal Care- Guidelines on: Antibody production – <http://www.ccaac.ca>.(consultado em Maio de 2006)
- Leenaars M. ;Henndriksen CFM 2005- Critical steps in the production of polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and recommendations .*ILAR Journal* 46(3):269-279.

CAPÍTULO 7

Octavio Augusto França Presgrave &
Belmira Ferreira dos Santos

SANGRIA

INTRODUÇÃO

Diversos estudos necessitam que seja realizada a coleta de sangue para verificar alterações hematológicas ou outros parâmetros necessários ao entendimento, avaliação e conclusão da pesquisa.

Todo pesquisador deve ter a consciência de que essa coleta representa, em diferentes graus, um estresse para o animal, seja pelo procedimento em si ou pelo uso de anestésicos. Também é altamente recomendável que o operador seja treinado e tenha conhecimento da anatomia do animal, de forma a localizar o vaso correto definido pelo protocolo e de forma rápida e precisa.

É importante que os métodos sejam refinados de forma que necessitemos coletar apenas pequenos volumes de sangue. Entretanto, existem situações críticas onde o pequeno tamanho dos animais influencie no volume ou frequência da coleta. Neste caso, não se deve colocar em risco o bem estar dos animais, nem usar um número maior dos mesmos.

A necessidade de coleta freqüente de sangue deve levar em consideração a possibilidade de uso de cânulas, que substituiria as punções repetidas. No caso de se aquecer o animal, deve-se tomar cuidado para evitar hipertermia, que se manifesta com sinais, tais como, aumento da freqüência respiratória e salivação. Não se recomenda o uso de dilatadores (p.ex. xilol), tendo em vista que causam irritação cutânea. Ressalta-se a necessidade da assepsia do local onde será procedida a coleta.

SANGRIA VENOSA

Volumes até 0,1 mL

Deve-se puncionar uma veia superficial. Em geral, não necessita anestesia, uma vez que esta submetteria o animal a um estresse maior do que o causado pelo uso de uma agulha, por exemplo.

Em geral, pequenos animais podem ser sangrados pela veia caudal (coccígea). Camundongos, ao contrário dos ratos, podem ter a extremidade da cauda amputada para coleta de sangue, uma vez que não oferece risco de eliminação de vértebra. Recomenda-se

o corte na cauda, no máximo, duas vezes. Como alternativa, pode-se retirar o tampão cicatricial para nova coleta.

Pequenos animais sem cauda (cobaias e hamsters) podem ter o sangue coletado pela veia jugular ou da orelha, sendo que esta última necessita de grande habilidade. Em animais grandes podem-se usar veias superficiais.

Os locais recomendados para sangria se encontram na tabela 1.

Volumes acima de 0,1 mL

Normalmente se consegue coletar essas quantidades de sangue de animais maiores sem o uso de anestesia, entretanto, em animais menores, uma anestesia de curta duração pode ser necessária, sempre levando em consideração que seu uso poderá afetar parâmetros hematológicos ou bioquímicos.

Deve-se ter especial atenção ao calibre da agulha, pois, um calibre pequeno pode provocar coagulação e um calibre maior pode danificar o vaso. Em alguns casos, a dilatação do vaso por obstrução suave ou aquecimento poderá facilitar a coleta.

Os locais recomendados para sangria se encontram na Tabela 1.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

- 1) A coleta de sangue pelo plexo orbital não é recomendada quando há a recuperação do animal. Coletas repetidas por esta via somente é justificável quando não for possível o uso de outro método. Este tipo de coleta deverá ser realizado, sempre, com o uso de anestésico local (colírio anestésico). Ao final deve-se aplicar pomada oftálmica.
- 2) O volume máximo de coleta de sangue em uma só ocasião é de 10% do volume total. Acima desse percentual, surgirão complicações que poderão levar o animal a alterações significativas, choque e até morte. A coleta de 10% do volume de sangue somente poderá ser repetida depois de 3 a 4 semanas. Se houver necessidade de coletas repetidas, em intervalos mais curtos, no máximo 1% do volume de sangue poderá ser retirado a cada 24 horas. O volume médio de sangue circulante para cada animal se encontra na Tabela 2.
- 3) A punção cardíaca deverá sempre ser realizada sob anestesia. Quando se aplica este procedimento com fim terminal, deverá se assegurar o óbito pós-exsangüinação pela administração de uma sobredose de anestésico. A punção cardíaca repetida não é recomendada, mas, se necessária, deverá ser cuidadosamente justificada em função de seus efeitos adversos. Neste caso, deverá se dar preferência à canulação de longa duração.

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

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

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

TABELA 2 – VOLUME DE SANGUE CIRCULANTE EM ANIMAIS CONVENCIONAIS E NÃO CONVENCIONAIS ADULTOS, SADIOS E ALIMENTAÇÃO ADEQUADA.

	mL/kg
Gato	47-66
Gado	60
Frango	60
Cão	79-90
Furão	75
Gerbil	67
Cabra	70
Cobaia	67-92
Hamster	78
Cavalo	75
Camundongo	78-80
Porcos	65
PNH*	54
Coelho	44-70
Rato	50-70
Ovelha	60

*PNH - primatas não humanos

REFERÊNCIAS

Morton DB, Abbot D, Barclay R, Close BS, Ewbank R, Gask D, Heath M, Mattic S, Poole T, Seamer J, Southee J, Thompson A, Trussel B, West C, Jennings M. (1993) Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Laboratory Animals* **27**:1-22.

Canadian Council On Animal Care (1998). *Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación*. v.1 Extraído de:

http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/SPANISH/toc_v1.htm

CAPÍTULO 8

Fátima Conceição-Silva &
Celina Bessa

EUTANÁSIA

PRINCÍPIOS GERAIS

Eutanásia (eu=bom; thanatos= morte) é palavra de origem grega que significa “morte serena”, sem sofrimento. É considerada a forma correta de interromper procedimentos experimentais quando é detectado qualquer tipo de reação adversa, ou ao final de uma experimentação, mesmo que bem sucedida. Pelas normas éticas, a não ser em casos específicos e excepcionais, animais não devem ser reutilizados.

Evitar o sofrimento, minimizar o desconforto e dor durante qualquer procedimento envolvendo o uso de animais em experimentação é um compromisso do pesquisador. A determinação do momento da eutanásia deve levar em consideração o protocolo experimental e o bem-estar do animal. A escolha dos protocolos deve contemplar o maior benefício, o melhor resultado, com a utilização do menor número de animais possível.

A eutanásia deve ser realizada por método que produza inconsciência com analgesia rápida e morte subsequente, **sem nenhuma evidência de dor ou agonia** do animal. Neste contexto, a escolha do método deve também evitar a excitação do animal, ser irreversível, produzir o mínimo de contenção, além de ser apropriado para a idade, espécie e estado de saúde do animal. Também não pode ser esquecida a necessidade de segurança física e emocional para o pesquisador. A realização da eutanásia requer pessoal treinado e experiente, bem estruturado emocionalmente, consciente da importância do procedimento. Não é permitida a realização do procedimento por menores de idade. O método deve reproduzir o menor impacto na natureza e ser realizado em local apropriado, longe da área onde outros animais são mantidos. Por fim o método escolhido, dentro destes parâmetros, não deve resultar em modificações biológicas, histológicas ou outras incompatíveis com o protocolo experimental.

Mesmo levando-se em consideração as particularidades de algumas espécies como a paralisação de coelhos e galináceos frente a situações de estresse, alguns sinais podem ser considerados gerais para a maioria dos animais usados em experimentação. Dentre eles podemos citar como indício de sofrimento: vocalização, tentativa de fuga, agressão defensiva, salivação, emissão de fezes e urina, midríase, taquicardia, sudorese, tremores, espasmos musculares. Por último, é importante reafirmar a necessidade de local específico para a realização do procedimento, já que a vocalização e a liberação do conteúdo de glândulas de odor ou a secreção de ferormônio pode ser sentida por outros animais levando a situação de angústia desnecessária. A morte do animal deve ser confirmada por apnéia seguida de parada cardíaca. É preciso lembrar que a apnéia por si só não significa morte, pois muitos medicamentos produzem apnéia com manutenção de contração cardíaca.

ALGUNS EXEMPLOS E ESCLARECIMENTOS SOBRE MÉTODOS DE EUTANÁSIA (para detalhamento ver tabela ao final deste capítulo)

Dependendo da espécie animal e do protocolo de experimentação vários modos de eutanásia podem ser indicados (detalhamento apresentado abaixo). No entanto, de um modo geral podemos classificar a eutanásia em química e física. Como método físico podemos citar: a utilização de trauma físico cerebral, eletrocussão e decapitação. São usados em situações particulares, principalmente em casos em que a administração de drogas pode alterar a obtenção de resultados. **Estes métodos devem ser evitados.** A eutanásia por meios físicos deve ser feita por pessoal bem treinado, pois, se não houver precisão pode acarretar sobrevida temporária com sofrimento animal. Para sua aprovação o responsável deve demonstrar de maneira inequívoca que outro método não pode ser aplicado. Desta forma, sua utilização é restrita a casos muito específicos e devem ser analisados de forma individual podendo não ser aceita nas condições propostas.

O deslocamento cervical é usado para aves, pássaros, alguns répteis e anfíbios, além de camundongos. É rápido e eficaz e pode ser obtido por tração ou pressão sobre a região da nuca. Ocorre parada respiratória imediata seguida de hipóxia e parada cardíaca. Algumas vezes nestes casos, podem ser observados efeitos de contração muscular que estão associados à despolarização das células nervosas e não à presença de dor ou estresse.

A decapitação só é aceita em peixes de pequeno porte, além de roedores recém-natos, pois nestes casos os animais são resistentes às drogas tanto injetáveis quanto inalantes. Neste grupo, as terminações nervosas ainda não são completas e a sensação dolorosa é diminuída ou ausente. A utilização em outros animais / faixas etárias não é permitida.

A eletrocussão produz depressão cerebral direta e parada cardíaco – respiratória imediata, se usada na dosagem correta que pode variar com a espécie do animal, idade, peso etc. No entanto, comumente vem acompanhada de contrações musculares involuntárias. Devido à dificuldade de execução e ao efeito adverso observado este método não é indicado em nosso meio.

A eutanásia por exsanguinação não é permitida sem uma prévia sedação. Em adição, mesmo nestes casos só é permitida quando comprovada a necessidade de coleta de amostras de sangue em quantidades que não possam ser obtidas por outros meios. Deve ser realizada por pessoal capacitado, pois requer precisão e rapidez de execução. A aprovação só poderá ocorrer se a justificativa for consistente e de acordo com as normas internacionais vigentes.

A prática de traumatismo crânio – encefálico apesar de constar dos guias internacionais é fortemente desaconselhada, pois sua aplicação exige precisão e a possibilidade de falha na aplicação do método não compensa a rapidez.

De um modo geral, a eutanásia química deve ser o método de escolha. Estes métodos têm como base a aplicação de superdosagem de fármacos que gerem inconsciência (ausência de reflexo pupilar, caudal e outros) e analgesia rápida seguidas de parada cardíaco – respiratória. As substâncias mais comumente empregadas são os barbitúricos e os anestésicos. A via de administração mais eficaz é a endovenosa, podendo ser substituída em algumas espécies pela via intraperitoneal nos caso de dificuldade de obtenção de acesso venoso.

Na avaliação da escolha do método mais apropriado em cada protocolo é preciso levar em consideração: a espécie de animal, a rapidez, eficácia, a compatibilidade com a

obtenção de resultados e a segurança para o operador. Desta forma, apesar de ser possível a utilização de um número variado de métodos de eutanásia, as condições gerais devem sempre ser observadas. A seguir resumiremos alguns detalhes sobre os agentes químicos mais comumente empregados e cujas especificações podem também ser encontradas no capítulo sobre analgesia / anestesia.

Para a eutanásia de animais de pequeno porte considerados não convencionais (ver classificação dos animais usados em experimentação constante neste manual) como cães, gatos, alguns animais de sangue frio e primatas não humanos, o uso de sedação (xilazina / quetamina / diazepínicos / acepromazina) seguida por superdosagem de derivados do ácido barbitúrico como o pentobarbital e o tiopental são os mais indicados devido à facilidade de aplicação, aliada a ação rápida e grande eficácia. Quetamina isolada não deve ser usada pela dificuldade de verificação do efeito de sobredose. A ação dos barbitúricos se inicia por uma depressão profunda e rápida dos centros respiratórios levando à apnéia seguida de parada cardíaco – respiratória. De forma geral a dose para a eutanásia deve ser calculada com base no peso do animal e situa-se entre três a quatro vezes a normalmente empregada para anestesia / sedação (para detalhes consulte capítulo referente). A via de escolha é a endovenosa e, na impossibilidade desta pode-se usar a via intraperitoneal. A exceção são animais aquáticos que, dependendo do tamanho podem receber a droga diluída na água em que estão sendo mantidos.

Animais de porte maior como eqüinos e canídeos maiores também são sedados e a seguir submetidos a uma superdosagem de barbitúricos (tiopental sódico). Em alguns casos, depois de obtida a anestesia pode-se acelerar o procedimento com a injeção de solução saturada de sulfato de magnésio \ cloreto de potássio, sempre resguardado o bem – estar do animal e a obtenção dos resultados sem interferência das drogas para eutanásia.

Não se recomenda a utilização de anestésicos inalatórios como o halotano, isoflurano devido a potencial capacidade de produzir acidentes nos profissionais responsáveis pela manipulação.

Um dos métodos mais empregados é a inalação de gases não anestésicos. Devido à periculosidade para o operador (hepatotoxicidade, cardiotoxicidade e/ou carcinogênese) e as reações irritativas no animal o **uso de éter e clorofórmio é proibido**. Em adição, o éter é inflamável e explosivo podendo causar acidentes graves. Carcaças embebidas em éter não podem ser incineradas ou autoclavadas sem haver eliminação prévia dos resíduos.

Atualmente o CO₂ é o gás aceito como de melhor eficácia / rapidez para a eutanásia de animais de pequeno porte como camundongos e outros pequenos roedores. Animais maiores como coelhos, podem ser eutanasiados com CO₂ contanto que recebam pré – anestesia como xilazina / diazepam, midazolam, entre outros. A forma ideal de administração é a utilização de câmaras apropriadas com válvulas para controle da entrada de gás e com vedação eficiente. A administração deve ser lenta para que o animal entre em narcose antes da parada cardíaco – respiratória. Fluxos muito intensos podem causar estresse desnecessário levando a agitação, eliminação de urina e fezes e outros sinais de desconforto. Concentrações em torno de 40% no interior da câmara levam a sedação seguida de anestesia e morte neste grupo. Outros animais como cães e gatos podem necessitar de doses maiores (60%). Este tipo de eutanásia também pode ser empregado para outros animais desde que resguardas as particularidades de cada um. Não esquecer que animais recém – natos podem ser resistentes a esta forma de eutanásia. Animais que podem viver em condições de anaerobiose relativa como peixes e anfíbios são normalmente resistentes a este processo. Estudos já publicados têm demonstrado não haver nenhuma

repercussão de alteração de tecidos que contra – indique sua utilização na maioria dos experimentos realizados em laboratórios de pesquisa.

Pássaros podem ser eutanasiados por inalação de CO (monóxido de carbono) comprimido em cilindros. Não são aceitas outras formas de emissão de CO. Este agente também não é recomendado devido à potencialidade de produção de acidentes.

Outra droga não permitida é o cianeto de potássio, pois sua utilização leva ao aparecimento de convulsões e contraturas antes da morte.

Lembramos que algumas drogas podem ser extremamente eficazes num grupo de espécies e completamente contra – indicadas em outras. Deve-se tomar especial atenção a animais que foram previamente tratados com agentes paralisantes como o curare, succinilcolina, sulfato de nicotina etc., pois neste caso a ausência de reflexos ou mesmo a depressão respiratória não necessariamente significam inconsciência e por isto o animal pode estar sensível a estímulos dolorosos sem, contudo conseguir promover reações que exteriorizem esta condição.

De forma resumida, a escolha do procedimento de eutanásia deve levar em consideração a espécie animal (tipo, idade, peso etc.), as condições experimentais e a prática do operador. De todos os métodos aqui exemplificados os mais aceitos são a inalação de CO₂ e a superdosagem de barbitúricos.

Ao submeter um projeto em cujo protocolo seja necessária a utilização da eutanásia, o pesquisador deve fornecer todos os detalhes para que a eficiência, propriedade e condições do procedimento possam ser avaliadas. Sempre que necessário, os procedimentos poderão ser questionados e alternativas propostas. Os critérios para a utilização de eutanásia na presença de efeitos adversos devem estar claramente explicitados (“end point”).

DESCARTE DOS ANIMAIS APÓS EUTANÁSIA

Mesmo que não tendo sido infectado por nenhum agente patogênico durante a experimentação, os animais devem ser considerados como potencialmente infectados. De forma geral, animais de pequeno porte devem ser autoclavados para posterior descarte em lixo biológico destinado à incineração. Animais de porte médio e grande devem ser enviados a fornos crematórios, devidamente embalados e identificados de acordo com as normas de biossegurança existentes no Campus. Alternativamente, na impossibilidade de uso de autoclave, os animais podem ser formolizados por exposição de vísceras a aplicação de formol 10%. No entanto, é preciso frisar que este método não é recomendável devido à geração de resíduos tóxicos e sua utilização em nossa Instituição deve ser abolida o mais breve possível.

ALGUNS GRUPOS DE ANIMAIS E SEUS MÉTODOS DE EUTANÁSIA

- Ver também resolução nº. 714 de junho de 2002 – Conselho Federal de Medicina Veterinária
- Alguns animais devem ser submetidos à eutanásia sob a responsabilidade de um médico veterinário.

Método de eutanásia	Roedores e coelhos pequenos	Roedores e coelhos maiores	Cães e gatos
CO ₂	Método de escolha (dependendo do peso), alguns grupos consideram que mesmo animais pequenos devem ser submetidos a superdosagem de barbitúricos.	Método de escolha (dependendo do peso). Animais maiores que 1 kg devem ser submetidos à superdosagem de barbitúricos	Não aceito
Superdosagem de barbitúrico (EV ou IP)	Método de escolha	Método de escolha	Método de escolha (apenas por via EV)
Superdosagem de anestésico	Método de escolha	Método de escolha	Método de escolha
Exsanguinação em animal anestesiado	Outro método aceitável	Outro método aceitável	Não aceito
KCl EV em animais previamente sedados	Outro método aceitável	Outro método aceitável	Outro método aceitável
Decapitação	Apenas em recém-natos de roedores	Não aceito	Não aceito
Deslocamento cervical	Aceito para camundongos	Não aceito	Não aceito
Crioeutanasia (nitrogênio líquido - N ₂)	Aceito para recém-nato de camundongos e ratos, além de peixes pequenos	Não aceito	Não aceito

Método de eutanásia	aves	peixes	Répteis e anfíbios
CO ₂	Método aceitável	Método aceitável	Método aceitável desde que o animal não seja resistente ao CO ₂
Superdosagem de Barbitúrico EV	Método de escolha	Método de escolha	Método de escolha
Superdosagem de anestésico	Método de escolha	Método aceitável	Método de escolha
Exsanguinação em animais anestesiados	Método aceitável	Não utilizado	Não utilizado
Decapitação	Método aceitável	Método de escolha em exemplares pequenos	Aceitável dependendo da espécie

Métodos de eutanásia	Primatas não humanos
CO ₂	Não aceitável
Superdosagem de barbitúricos EV Após sedação	Método de escolha
Superdosagem de anestésicos Após sedação	Método de escolha
Outros métodos	Não aceito

DETALHAMENTO

Usar sempre a via endovenosa ou intraperitoneal, com veículo na temperatura ambiente, agulha de calibre apropriado para cada espécie assim como volumes apropriados (ver capítulo referente a inoculações). A dosagem, se não especificada, deve ser de três a quatro vezes a dose usada para anestesia (vide tabelas no capítulo anestesia / sedação constante neste guia de procedimentos).

animal	Especificações e pré-tratamento	Método de eutanásia de escolha^{*1}	observações
Camundongos	adultos	CO ₂ (40% em ar atmosférico com administração lenta) seguido de deslocamento cervical	Superdosagem de anestésicos e barbitúricos podem ser usadas principalmente no caso de necessidade de sangria branca; também é aceito o deslocamento cervical, se realizado por pessoal treinado.
camundongos	Recém-natos, embriões ou fetos.	Decapitação/crioeutanásia	São resistentes ao CO ₂
Hamster / gerbil e similares	Se necessário usar sedação prévia com xilazina ou diazepam.	CO ₂ (40% em ar atmosférico com administração lenta)	Considerar superdosagem anestesia ou tiopental sódico
Ratos	Se necessário, sedação prévia com xilazina ou diazepam	CO ₂ (40% em ar atmosférico com administração lenta)	Considerar superdosagem anestesia ou tiopental sódico
cobaias	Sedação prévia com xilazina ou diazepam	Superdosagem de tiopental sódico	Pode-se fazer sangria branca sob anestesia. Nestes casos deve-se verificar a morte do animal
coelhos	Sedação prévia com diazepam, midazolam, xilazina.	Superdosagem de tiopental sódico	Pode-se sedar o animal e fazer sangria branca. Nestes casos deve-se sempre aplicar uma superdose de barbitúrico após para ter certeza da morte do animal
Outros roedores, usados em laboratório.	Acepromazina + quetamina	Superdosagem de tiopental sódico	CO ₂ (40% em ar atmosférico com administração lenta)
Outras espécies de roedores de origem silvestre*2	Acepromazina + quetamina	Superdosagem de tiopental sódico	CO ₂ (40% em ar atmosférico com administração lenta)

Outros animais silvestres *2	Obrigatório o pré-tratamento com sedação do animal	Superdosagem de barbitúricos (como o tiopental sódico)	-----
Primatas não humanos qualquer porte	Sedação com quetamina + diazepam	Superdosagem de tiopental sódico	Ajustar a dose ao porte do animal
Aves	Em determinadas condições CO ₂ pode ser aceito	Superdosagem de tiopental sódico	Pode-se sedar o animal e fazer sangria branca. Nestes casos deve-se sempre aplicar uma superdose de barbitúrico após, para ter certeza da morte do animal
anfíbios	-----	barbitúricos	CO ₂
répteis	-----	barbitúricos	CO ₂
peixes	Observar o tamanho do animal	Decapitação (pequenos) ou anestésicos como benzocaína (maiores)	Alternativamente peixes muito pequenos podem ser eutanasiados com a diluição do anestésico na água do aquário
Cães	Acepromazina + quetamina	Superdosagem de tiopental sódico EV	-----
Gatos	Xilazina ou acepromazina + quetamina	Superdosagem de tiopental sódico EV	-----

*1- de acordo com determinados protocolos, e por solicitação do responsável, a CEUA poderá avaliar outros métodos. A decisão será tomada caso a caso, levando-se em consideração o custo benefício e o bem – estar animal.

*2- animais silvestres devem ter licença do IBAMA para captura, transporte, criação e eutanásia. A não ser em casos excepcionais, avaliados um a um, animais silvestres não podem ser introduzidos no Campus e toda a manipulação, inclusive eutanásia, deve ser feita em local apropriado próximo às áreas de captura. As carcaças podem ser taxidermizadas (para depósito em coleção) ou formolizadas e encaminhadas para incineração. Os tecidos e secreções obtidos devem ser condicionados e transportados de acordo com as normas de biossegurança do Campus.

REFERENCIAS

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE- <http://www.ccac.ca>

CCAC, guide volume 1 (2nd edition), 1993

American Society Of Ichthyologists And Herpetologists, The Herpetologists' League, And The Society For The Study Of Amphibians And Reptiles. Guidelines For The Use Of Live Amphibians And Reptiles In Field Research. J. Herpetol. 1987; 4 (Suppl.): 1-14.

American Society Of Ichthyologists And Herpetologists, American Fisheries Society, American Institute Of Fisheries Research Biologists. Guidelines For The Use Of Fishes In Field Research. Copeia (Suppl.) 1987: 1-12.

American Veterinary Medical Association. 1993 Report Of The AVMA Panel On Euthanasia. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1993; 202(2): 229-249.

<http://www.nature.com/nature/journal/v441/n7093/full/441550a.html>

<http://www.nature.com/nature/journal/v441/n7093/full/441570a.html>

Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Disposição sobre os métodos de anestesia e eutanásia em animais

CAPÍTULO 9

Norma Labarthe &
Etelcia Moraes Molinaro

PESQUISAS COM ANIMAIS SILVESTRES

Animais Silvestres - todos aqueles animais pertencentes às espécies nativas, migratórias e quaisquer outras, aquáticas ou terrestres, que tenham todo ou parte de seu ciclo de vida ocorrendo dentro dos limites do território brasileiro, ou em águas jurisdicionais brasileiras. Ampliando a abrangência de proteção conferida à fauna silvestre, inclui-se também a proteção dos seus ninhos, abrigos e criadouros naturais, considerados propriedade do Estado. Para os fins operacionais, excetuam-se dessa definição os peixes, crustáceos e moluscos susceptíveis a pesca e que são regidos por normas específicas.

<http://www.ibama.gov.br/fauna/conhecimentos.php>

A CEUA entende que os pesquisadores deverão atender à legislação vigente em todas as etapas de seus trabalhos, portanto, trabalha para que a ética e a legislação sejam respeitadas em todas as suas dimensões.

Informamos que todas as atividades com animais silvestres devem estar em consonância com as diretrizes da Comissão de Biossegurança/Fiocruz, bem como com a documentação exigida pelos organismos reguladores, tais como o IBAMA, Institutos Ambientais Estaduais ou Municipais, de coleções biológicas científicas e Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGen). **A aprovação da CEUA não exclui a necessidade destas aprovações e licenças para a realização dos procedimentos, sendo os proponentes responsáveis por suas aquisições antes de iniciar seus trabalhos.**

DETALHAMENTO DOS PROCEDIMENTOS DE:

Captura: Deverão ser sempre detalhadas armadilhas (fabricante, modelo, dimensões e material, incluindo calibre da tela ou grade e isca a ser utilizada) ou puçás (material, diâmetro da boca, trama da tela etc.).

Quando o animal for capturado por procedimento químico (arma ou zarabatana) deve-se observar a distância provável entre o operador e o animal, porte físico, (espécie pretendida e possível distúrbio na comunidade silvestre local). Também deverá constar o tipo, volume e concentração do componente

químico a ser usado, além do tempo médio de contenção, formas de controle de sedação e da recuperação do animal.

Além disso, a descrição do número de armadilhas e do tempo que cada armadilha permanecerá no local, além do intervalo entre sua colocação e visitas subsequentes, número de expedições no mesmo local e avaliação do estoque genético, deverão permitir que o leitor tenha plena percepção de cada etapa a ser executada, inclusive com a informação de tempo médio de cativeiro antes do recolhimento/ soltura do animal. Nesta descrição deverão ser detalhados os procedimentos especiais em casos de injúrias e traumatismos sofridos pelos animais capturados ou no caso captura de animais gestantes ou filhotes. **Deve-se evitar a utilização de fêmeas de qualquer faixa etária.**

Manipulação: Deverão ser detalhados cuidados com o transporte dos animais capturados e que incluam se o animal será retirado da armadilha, se será transportado sob sedação e como será o deslocamento à base de campo. Qualquer contenção química deverá ser cuidadosamente detalhada. Todos os procedimentos realizados com os animais capturados deverão ser explicitados, incluindo tempo máximo de manutenção de cada indivíduo, tipo das gaiolas de manutenção, número de animais por gaiola, alimentação e condições de abrigo.

Detalhar plano de marcações visual (visa evitar a manipulação duplicada no mesmo animal) e permanente (recomenda-se o uso de microchips).

Descrever detalhadamente o *end point* e procedimentos de eutanásia em casos de acidente durante os trabalhos, sem omitir o destino das carcaças.

Todos os procedimentos visando às condições de segurança do animal e manipuladores devem ser detalhados. A aprovação do procedimento pela CEUA não é garantia de sua realização, já que outros parâmetros como normas de biossegurança (veiculação de agentes patogênicos), controle de diversidade genética e proteção ambiental também fazem parte dos documentos necessários a realização dos procedimentos de transporte e manipulação.

Soltura: Descrever como será garantido que a soltura será realizada no mesmo local da captura, com horário e condições climáticas da soltura e condições individuais de cada animal a ser solto.

A CEUA se baseia principalmente na Lei de Crimes Ambientais e na Instrução Normativa No. 154 de 01 de Março de 2007 do Ibama, brevemente apresentadas abaixo:

A Lei de Crimes Ambientais (Lei No. 9.605 de 12 de fevereiro de 1998) considera crime contra a fauna a manutenção de animais silvestres em cativeiro sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente. No caso específico de fauna silvestre entende-se como autoridade competente o IBAMA.

A manutenção de animais silvestres em cativeiro também é considerada crime se a origem dos animais não estiver devidamente documentada através de **nota fiscal** emitida pelo comerciante ou pelo criadouro que tem autorização do IBAMA para reproduzi-los em cativeiro. Nessa nota fiscal deve constar o nome científico e popular do animal, o tipo e o número de identificação individual do espécime (animal), que poderá ser uma anilha fechada, tatuagem permanente e/ou um microchip.

Segundo a Instrução normativa No. 154 de 01 de Março de 2007 (DOU No. 42 de 02/03/2007, Seção 1, página 57-59), o Ibama estabeleceu o Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio) e fixou normas sobre a realização de:

1. Coleta de material biológico;
2. Captura ou marcação de animais silvestres *in situ*;
3. Manutenção temporária de espécimes de fauna silvestre em cativeiro;
4. Transporte de material biológico;
5. Recebimento e envio de material biológico ao exterior e,
6. Realização de pesquisa em unidades de conservação federal ou em cavidade natural subterrânea.

DEFINIÇÕES:

Captura - deter, conter ou impedir, temporariamente, por meio químico ou mecânico, a movimentação de um animal, seguido de soltura.

Coleta – obtenção de organismo silvestre animal, vegetal, fúngico ou microbiano, seja pela remoção do indivíduo do seu habitat natural, seja pela coleta de amostras biológicas.

Transporte – deslocamento de material biológico no território nacional, plataforma continental, no mar territorial, ou na zona econômica exclusiva.

Pesquisador – profissional graduado ou de notório saber, que desenvolva atividades de ensino e pesquisa vinculada à instituição científica.

Licença permanente – ato administrativo vinculado pelo qual o IBAMA faculta ao pesquisador o direito de realizar a captura, a coleta, e o transporte de material biológico de espécies da fauna silvestre, por período indeterminado, desde que, atendido os requisitos previstos.

Material biológico – organismos ou partes desses.

Instituição Científica – Instituição brasileira de ensino e pesquisa ou de pesquisa que desenvolva atividades de pesquisa de caráter científico ou tecnológico.

No Artigo 16 daquela Instrução fica o pesquisador obrigado a apresentar parecer do Comitê de Ética da instituição a qual está vinculado quando o projeto visar à utilização de espécimes vivos de vertebrados silvestres em experimentos científicos.

DROGAS PARA USO NO CONTROLE DA DOR DURANTE PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS COM ANIMAIS NÃO CONVENCIONAIS (SILVESTRES)

	Primatas	Marsupiais*	Procionídeos	Mustelídeos	Observações
Tiopental	8-10mg/kg(IV)	5mg/kg(IP)	—	—	Pouca analgesia, indicado para procedimentos não cirúrgicos
Diazepam	0,5mg/kg (IM)	0,1-0,5mg/kg(IM)	0,5- 1mg/kg(IM)	0,5-1mg/kg (IM)	Sedação
Ketamina	10-15mg/kg(IM)	15-30mg/kg (IM)	10-15mg/kg (IM)	10-15mg/kg (IM)	Anestesia para procedimentos rápidos. Pouca analgesia
Ketamina +Xilazina	10mg/kg(IM) 2mg/kg(IM)	10mg/kg(IM) 1mg/kg (IM) (atropina)	5-10mg/kg(IM) 0,5-1mg/kg(IM)	10mg/kg(IM) 2mg/kg(IP)	Anestesia cirúrgica para procedimentos rápidos e pouco dolorosos
Tiletamina +Zolazepan	2-6mg/kg (IM)	5-10mg/kg(IM)	2-8mg/kg (IM)	3-6mg/kg (IM)	Sedação rápida
Fentanil + Droperidol	0,05-1mL/kg (IM)	0,4mg/kg(IM)	—	—	Grande analgesia. Recomendado para procedimentos cirúrgicos com abertura de cavidades

IP – intraperitoneal IV – intravenoso IM - intramuscular

Marsupiais – Família Didelphidae (gambá, cuíca, etc)

Mustelídeos – Família Mustelidae (furão, ferret, lontra, etc).

Procionídeos – Família Procyonidae (quati, mão-pelada, etc.).

*Marsupiais com menos de 250g de peso, são imobilizados mais facilmente com anestesia volátil sob máscara (halotano ou isoflurano + oxigênio).

COLETA DE SANGUE – PRIMATAS, MARSUPIAIS, MUSTELÍDEOS E PROCIONÍDEOS*.

Tamanho do animal	Primata	Marsupial	Mustelídeo	Procionídeo
Pequeno ou filhote	Veia femoral – agulha 13x4,5	Veia jugular – agulha 13x4,5	Veia jugular – agulha 13x4,5 ou 20x5,5	Veia jugular – agulha 13x4,5 ou 20x5,5
Médio	Veias cefálica ou femoral ou braquial ou safena lateral – agulha 20x5,5 ou 25x6,0	Veias jugular ou femoral – agulha 20x5,5 ou 25x6,0	Veias cefálica ou femoral ou safena lateral ou jugular – agulha 25x7,0	Veias cefálica ou femoral ou safena lateral ou jugular – agulha 25x7,0
Grande	Veias cefálica ou femoral ou braquial ou safena lateral – agulha 25x8 ou 30x8,0	Veias jugular ou femoral ou safena lateral – agulha 25x7,0	Veias cefálica ou femoral ou safena lateral ou jugular – agulha 25x7,0 ou 30x8,0	Veias cefálica ou femoral ou safena lateral ou jugular – agulha 25x7,0 ou 30x8,0

*animais contidos quimicamente - sedados

INJEÇÕES INTRAMUSCULARES - PRIMATAS, MARSUPIAIS, MUSTELÍDEOS E PROCIONÍDEOS.**

Tamanho do animal	Primata	Marsupial	Mustelídeo	Procionídeo
Pequeno ou filhote	Músculos semi membranáceo ou semitendíneo – agulha 13x4,5	Músculos semi membranáceo ou semitendíneo – agulha 13x4,5	Músculos semi membranáceo ou semitendíneo – agulha 13x4,5	Músculos semi membranáceo ou semitendíneo – agulha 13x4,5
Médio	Músculos semi membranáceo ou semitendíneo – agulha 20x5,5 ou 25x6,0	Músculos semi membranáceo ou semitendíneo – agulha 20x5,5	Músculos semi membranáceo ou semitendíneo – agulha 25x6,0	Músculos semi membranáceo ou semitendíneo – agulha 25x6,0
Grande	Músculos tríceps ou semi membranáceo ou semitendíneo – agulha 25x8 ou 30x8,0	Músculos semi membranáceo ou semitendíneo – agulha 25x6,0	Músculos semi membranáceo ou semitendíneo – agulha 25x6,0 ou 25x7,0	Músculos semi membranáceo ou semitendíneo – agulha 25x7,0

** animais contidos mecanicamente

Obs.: o volume da droga injetado no músculo dependerá do porte físico do animal

CAPÍTULO 10

ENDEREÇOS IMPORTANTES

PRINCIPAIS ENDEREÇOS ELETRÔNICOS PARA BUSCA DE PROCEDIMENTOS ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Biblioteca Virtual de Bioética
<http://www.ufrgs.br/bioetica/>

Canadian Council on Animal Care (CCAC)
<http://ww.ccac.ca>

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)
<http://www.cobea.org.br>

Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) –
IB/UNICAMP <http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

National Institutes of Health
<http://bioethics.od.nih.gov/animals.html>

Research Animal Resource (RAR)
<http://www.ahc.umn.edu/rar/>

Sociedade Brasileira de Bioética
<http://www.sbbioetica.org.br/default/default.asp>

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
<http://www.ufrgs.br/bioetica/>

ENDEREÇO DA CEUA FIOCRUZ

http://www.presidencia.fiocruz.br/vppdt1/com_etn_uso_anim_.php
email- ceua@fiocruz.br

ANEXO

PRINCÍPIOS ÉTICOS PARA O USO DE ANIMAIS DE LABORATORIO (conforme preconizado pelo COBEA)

ARTIGO I – Todas as pessoas que pratiquem a experimentação biológica devem tomar consciência de que o animal é dotado de sensibilidade, de memória e que sofre sem poder escapar a dor;

ARTIGO II – O experimentador é, moralmente responsável por suas escolhas e por seus atos na experimentação animal;

ARTIGO III – Procedimentos que envolvam animais devem prever e se desenvolver considerando-se sua relevância para a saúde humana o animal, a aquisição de conhecimentos ou o bem da sociedade;

ARTIGO IV – Os animais selecionados para um experimento devem ser de espécie e qualidade apropriadas a apresentar boas condições de saúde, utilizando-se o número mínimo necessário para se obter resultados válidos. Ter em mente a utilização de métodos alternativos tais como modelos matemáticos, simulação por computador e sistemas biológicos “*In vitro*”;

ARTIGO V – É imperativo que se utilizem os animais de maneira adequada, incluindo aí evitar o desconforto, angústia e dor. Os investigadores devem considerar que os processos determinantes de dor ou angústia em seres humanos causam o mesmo em outras espécies, a não ser que o contrário tenha se demonstrado;

ARTIGO VI – Todos os procedimentos com animais, que possam causar dor ou angústia, precisam se desenvolver com sedação, analgesia ou anestesia adequadas. Atos cirúrgicos ou outros atos dolorosos não podem se realizados em animais não anestesiados e que estejam apenas paralisados por agentes químicos e/ou físicos;

ARTIGO VII – Os animais que sofram dor ou angústia intensa ou crônica, que não possam se aliviar e os que não serão utilizados devem ser sacrificados por método indolor e que não cause estresse;

ARTIGO VIII – O uso de animais em procedimentos didáticos e experimentais pressupõe a disponibilidade de alojamento que proporcione condições de vida adequada às espécies, contribuindo para sua saúde e conforto. O transporte, a acomodação, a alimentação e os cuidados com os

animais criados ou usados para fins biomédicos devem ser dispensados por técnico qualificado;

ARTIGO IX – Os investigadores e funcionários devem ter qualificação e experiência adequadas para exercer procedimentos em animais vivos. Deve-se criar condições para seu treinamento no trabalho, incluindo aspectos de trato e uso humanitário dos animais de laboratório.