



**Biotério de Experimentação Animal
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas – USP**

Manual de Normas Técnicas

Prof. Dr. Carlos Taborda
Profa. Dra. Dolores U. Mehnert
Técnico Carlos Augusto da Silva

2004

PREFÁCIO

Os animais mantidos em um biotério devem ser respeitados e tratados com cuidado redobrado, uma vez que estão à serviço dos nossos interesses científicos.

Eles pedem muito pouco de nós pelo muito que nos oferecem.

Assim, o Biotério deve ser uma área livre de tumultos em geral, pouca conversa e respeito às normas de trabalho com o objetivo de manter o bem-estar dos animais.

Animais saudáveis e sem estresse, respondem muito melhor à experimentação, favorecendo a obtenção de resultados corretos e confiáveis nos experimentos realizados com estes animais.

ÍNDICE

I - HISTÓRICO	3
II - CONDIÇÕES AMBIENTAIS	4
III - INSTALAÇÕES.....	4
IV - NORMAS.....	6
V - VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DROGAS E INFECÇÃO.....	14
VI - COLETA DE SANGUE	17
VII - ANESTÉSICOS.....	18
VIII - EUTANÁSIA	22
IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

I - HISTÓRICO

O Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Microbiologia foi criado com o objetivo de fornecer aos pesquisadores as condições técnicas e de infraestrutura necessárias para a realização de experimentos nas várias áreas da Microbiologia, além de promover o bem-estar dos animais mantidos para fins de experimentação no Departamento.

Atualmente as atividades desenvolvidas são:

- a) Manutenção de algumas linhagens de camundongos, ratos, hamsters, cobaias e coelhos.
- b) Manutenção de animais imunizados para obtenção de antígenos e anticorpos específicos.
- c) Manutenção de animais infectados com microrganismos que apresentem risco de contágio classe II para seres humanos e outros animais.
- d) Manutenção de ovos embrionados para produção de antígenos virais.
- e) Realização de pequenas cirurgias e eutanásia de animais.

Em 1998-1999, foi realizada uma modernização das instalações com base no Programa de Infraestrutura para Biotérios da Fapesp (Processo N°. 95/04010-0):

Responsável: Prof. Dr. Sebastião Timóteo

Docentes : Profª. Dra. Charlotte Marianna Hársi
 Profª. Dra. Dolores U. Mehnert

Colaborações: Sr. Carlos Augusto da Silva (técnico)
 Sra. Naíde Farripas (administração)

II - CONDIÇÕES AMBIENTAIS

- ◆ Iluminação natural proveniente de janelas lacradas localizadas próximas ao teto.
- ◆ Temperatura ambiente mantida em torno de 21°C por aparelhos de ar condicionado (3 unidades de 18.000 BTUs), controlados por timer e 2 exaustores de teto.
- ◆ Ventilação constante, mantida por exaustores.

III - INSTALAÇÕES

ÁREA FÍSICA

Biotério localizado no 2º andar do Prédio II do ICB, compreendendo uma área total de aproximadamente 80 m² dividida em:

- ◆ 4 salas internas sendo uma para manutenção de animais em quarentena (recentemente chegados), duas para manutenção de animais inoculados (coelhos e camundongos/ratos) e uma para procedimentos cirúrgicos.
- ◆ área de isoladores
- ◆ área de recepção
- ◆ área de lavagem para bebedouros e gaiolas.

As áreas de recepção e lavagem são separadas das demais através de uma divisória.

Estas instalações foram aprovadas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para pesquisa com organismos geneticamente modificados (OGM) classe II conforme publicação em D.O. 31 de julho de 1998.

ÁREA DE QUARENTENA

Finalidade: recepção de animais recém-chegados a serem introduzidos no biotério. Os animais deverão permanecer no mínimo por 15 dias para ambientação e acompanhamento das condições de saúde antes de serem liberados para as demais áreas do setor.

OBS: neste setor encontra-se instalado o equipamento de CO₂ para eutanásia dos animais.

ÁREA DE MANUTENÇÃO

Finalidade: manutenção dos animais em experimentação, seja em gaiolas ou em isoladores. Visando evitar o estresse dos animais, este setor foi sub-dividido por espécie animal.

Sala 1 e 2 - camundongos, ratos, hamsteres e cobaias

Sala 3 - coelhos

Sala 4 – isoladores para coelhos e roedores

ÁREA DE PROCEDIMENTOS E CIRURGIAS

Finalidade: area para pequenos procedimentos cirúrgicos, inoculações e sangrias.

Materiais e equipamentos disponíveis: uma capela de fluxo laminar vertical classe II, mesa com tampo de granito e rodízios, caixa para contenção de coelhos e uma pia.

ÁREA DE LAVAGEM E PREPARO DE MATERIAL

Finalidade: área para processamento de todos os equipamentos e materiais utilizados na manutenção dos animais; estoque de ração e maravalha e materiais em geral

O quadro funcional restringe-se ao funcionário encarregado da rotina.

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS DISPONÍVEIS NO BIOTÉRIO

- ◆ 2 isoladores de pressão negativa para coelhos e cobaios/ratos, respectivamente
- ◆ 10 microisoladores para cobaios
- ◆ 20 microisoladores para camundongos
- ◆ Fluxo laminar vertical de classe II
- ◆ Geladeira
- ◆ Lavador MiniWap
- ◆ Autoclave horizontal (Central de Lavagem do Departamento)
- ◆ Sistema de pulverização para descontaminação de isoladores com ácido peracético
- ◆ Balança digital para peso de até 5 Kg
- ◆ Caixa de contenção para coelhos

- ◆ Gaiolas para coelhos (coelheiras) e camundongos
- ◆ Banheiras plásticas para cobaias (cobaieiras)
- ◆ Bebedouros e comedouros para camundongos e coelhos

OBS: a localização dos equipamentos nas respectivas áreas é apresentada na planta em anexo.

MATERIAL PARA MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

O Biotério de Experimentação Animal fornecerá tampas, bebedouros, marvalha e ração para todas as espécies animais alojadas em suas instalações.

O uso de microisoladores deverá ser previsto com antecedência e mediante consulta antes do recebimento dos animais. Os filtros de ar deverão ser previstos nos projetos de pesquisa e repostos ao setor pelo docente responsável.

Os usuários são responsáveis pelos materiais necessários nos procedimentos (luvas, seringas, gases, anestésicos, etc...) e em hipótese alguma, deverão utilizar o material destinado exclusivamente a manutenção do biotério.

Semestralmente é solicitada aos docentes que encaminhem em formulário próprio uma previsão de utilização do biotério a fim de se garantir a ração e a marvalha aos animais a serem alojados no setor durante o período. Em hipótese alguma, animais não previstos poderão ser alocados ou permanecer no biotério.

IV - NORMAS

HORÁRIO DE FUNCIONAMENTO

O Biotério de Experimentação Animal funciona de segunda a sexta das 8:00 às 17:00 horas.

No período da noite, finais de semana e feriados o acesso é restrito e somente os usuários autorizados, docentes e pós-graduandos, poderão entrar no biotério.

Alunos de graduação (iniciação científica/estagiários) somente terão acesso na presença de um docente ou supervisor. A chave deverá ser retirada na portaria do edifício (ICB II).

É de responsabilidade do docente solicitante a utilização do Biotério e manuseio da sua infraestrutura fora do horário de funcionamento.

USUÁRIOS

Todos os usuários do Biotério de Experimentação Animal deverão estar necessariamente ligados a um grupo de pesquisa do Departamento, devendo passar por um treinamento que será oferecido periodicamente.

Uma cópia do resumo do experimento enviado à Comissão de Experimentação Animal (CEA) do Instituto, bem como, de sua aprovação deverão ser entregues no biotério que manterá um arquivo com todos os processos.

PROCEDÊNCIA E QUALIDADE SANITÁRIA DOS ANIMAIS

Somente animais livres de vírus, ectoparasitos, e bactérias patogênicas de procedência sabidamente seguras poderão ser mantidos no biotério.

Animais silvestres ou de origem duvidosa em hipótese alguma poderão permanecer nas áreas do biotério, mesmo que seja por um período de adaptação ou transporte.

FORNECEDORES

Camundongos

Provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Parasitologia, Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia, Biotério da UNICAMP, Biotério do Instituto Butantã, Biotério Central da Faculdade de Medicina-USP e da Faculdade de Veterinária e Zootecnia-USP.

Ratos

Provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Cobaias

Biotério do Instituto Butantã e Biotério Central da Faculdade de Medicina-USP

Coelhos/hamsteres

Adquiridos de criadores credenciados, não tendo passagem por nenhum outro biotério de experimentação.

ANIMAIS PROVENIENTES DE QUALQUER OUTRA INSTITUIÇÃO/CRIADOR, SOMENTE PODERÃO TER ACESSO AO SETOR APÓS ANÁLISE PELOS RESPONSÁVEIS DO BIOTÉRIO. OS PEDIDOS DEVERÃO SER FEITOS COM NO MÍNIMO UMA SEMANA DE ANTECEDÊNCIA PARA ANÁLISE.

RAÇÃO E MARAVALHA

A ração a ser oferecida para as diferentes espécies de animais em manutenção no setor, bem com a maravalha são fornecidas pelo Biotério Central mediante pagamento com verba do Departamento de Microbiologia. Semestralmente é solicitado aos docentes que preencham um formulário com a previsão das espécies e número de animais a serem utilizados no próximo semestre e é com base nestes dados que as quantidades dos dois itens são fornecidas mensalmente ao Biotério de Experimentação.

O não preenchimento desta previsão pelo docente inviabilizará a manutenção dos seus animais no Biotério de Experimentação.

NORMAS GERAIS DE UTILIZAÇÃO DO BIOTÉRIO

1. O Biotério está estruturado para albergar coelhos, camundongos, ratos, hamsteres e cobaias, sendo vetada a manutenção de animais de outras espécies nestas dependências.
2. O uso das dependências do Biotério será autorizada somente para pesquisas submetidas e aprovadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA).
3. Todos os usuários deverão realizar curso de manejo de animais de experimentação e de biossegurança antes de iniciarem suas atividades neste setor.
4. É vetada a retirada de qualquer material do Biotério sem autorização dos responsáveis.

- 5.** É vetada a retirada de animais em experimentação do Biotério para manutenção nos laboratórios.
- 6.** Não desprezar animais mortos de qualquer espécie no lixo do Biotério sem autorização do funcionário responsável. Animais mortos que não puderem ser descartados de imediato deverão ser congelados e desprezados na primeira oportunidade.
- 7.** Comunicar com antecedência mínima de 15 dias a acomodação de animais de qualquer espécie no Biotério. Animais não previstos sómente serão aceitos mediante consulta aos docentes responsáveis pelo Biotério.
- 8.** Desprezar agulhas e seringas contaminadas na caixa especificamente identificada para este fim. Não jogar estes materiais no lixo.
- 9.** O uso das instalações do Biotério fica vetado para a realização de sangrias, inoculações ou quaisquer manipulações dos animais, todas às 2^a-feiras no período da manhã, para facilitar a faxina do local.
- 10.** Manter as salas limpas e em ordem após o uso.
- 11.** O uso da sala de cirurgia deverá ser previsto com antecedência e agendado. O uso simultâneo do local por grupos de pesquisa diferentes, que utilizam procedimentos distintos e trabalham com patógenos não será mais permitido, visando garantir uma segurança na manipulação realizada por todos.
- 12.** Faz-se obrigatória a comunicação de qualquer problema ou acidente aos responsáveis.
- 13.** Seguir as normas que estabelecem critérios para a utilização de animais em experimentações (em anexo).
- 14.** O fornecimento de materiais a serem usados nos procedimentos de sangria, inoculação de antígenos, etc., como agulhas, seringas, tubos de qualquer tipo, luvas cirúrgicas, materiais cirúrgicos, medicamentos (tabela em anexo), e anestésicos é de total responsabilidade do docente e/ou aluno, responsáveis pela pesquisa.
- 15.** Os materiais de consumo específicos para uso dos isoladores de pressão negativa, bem como os microisoladores deverão ser repostos ao Biotério pelo responsável pela pesquisa. Solicitar com antecedência ao docente responsável pelo Biotério, a lista dos filtros, membranas e fitas adesivas com as respectivas especificações a serem repostas.
- 16.** Em caso de ausência prolongada do funcionário do setor, como férias ou feriados prolongados, a manutenção dos animais (limpeza das gaiolas e

da área, bem como alimentação) será de responsabilidade de cada grupo de pesquisa usuário, devendo para isto ser designado um responsável por grupo.

ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

1. Todas as pessoas que praticam a experimentação biológica devem tomar consciência de que o animal é dotado de **sensibilidade, de memória e dor**.
2. O pesquisador é, moralmente, responsável por suas escolhas e por seus atos na experimentação animal.
3. Procedimentos que envolvam animais devem prever e se desenvolver considerando-se a sua relevância para a saúde humana ou mais, a aquisição de conhecimento ou o bem da sociedade.
4. Os animais selecionados para um experimento devem ser de espécie e qualidade apropriada e 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”.
5. É imperativo que se utilizem os animais de maneira adequada, incluindo 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.
6. Todos os procedimentos com animais, que possam causar dor ou angústia, precisam se desenvolver com sedação, analgesia ou anestesia adequados. Atos cirúrgicos ou outros atos dolorosos não podem se implementar em animais não anestesiados e que estejam paralisados por agentes químicos e/ou físicos.
7. Os animais que sentiram 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.
8. O uso de animais em procedimentos didáticos e experimentais pressupõe a disponibilidade de alojamento que proporcione condições de vida adequados 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 experimentais devem ser dispensados por técnicos qualificados.

9. Os pesquisadores 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.

PROCEDIMENTOS DE MANUTENÇÃO E MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS ADOTADOS DE ROTINA

Manuseio dos animais

- ◆ Animais recém-chegados são inicialmente mantidos por pelo menos 15 na área de quarentena e depois liberados para uso.
- ◆ Uma vez inoculados são transferidos para as respectivas salas conforme a espécie animal, onde são mantidos pelo tempo que durar o experimento.
- ◆ As trocas dos animais são realizadas duas vezes por semana (2ª-feira e 5ª-feira). No caso dos isoladores, as condutas poderão ser modificadas dependendo do experimento.
- ◆ O funcionário envolvido deverá usar avental, luvas de diversas espessuras conforme o tipo do trabalho, máscara e botas de borracha, quando necessário.

Descarte do material

- ◆ Maravalha e jornais sujos são colocados em sacos plásticos brancos e enviados para incineração juntamente com o lixo hospitalar do Instituto.
- ◆ Animais que não são mais úteis nos experimentos devem ser sacrificados, acondicionados em sacos plásticos brancos e congelados em freezer até serem enviados para incineração juntamente com o lixo hospitalar do Instituto.
- ◆ Agulhas e seringas utilizadas nas sangrias e inoculações são descartadas em caixas de papelão específicas para este uso. Quando cheias, as caixas são lacradas, autoclavadas e enviadas para incineração.
- ◆ Os materiais provenientes de animais manuseados dentro dos diversos tipos de isoladores como membranas, filtros, maravalha e ração são submetidos à autoclavação antes do descarte no lixo hospitalar.

- ◆ Gaiolas e bebedouros utilizados no interior dos isoladores são primeiramente autoclavadas e, em seguida, lavadas.

ÁREA DE MANUTENÇÃO

A limpeza do piso das salas deverá ser realizada diariamente por varredura e lavagem com água contendo desinfetante.

A troca das caixas, bebedouros e o fornecimento de ração são realizados duas vezes por semana (2ª -feira e 5ª-feira).

As caixas e bebedouros utilizados para manutenção de camundongos, ratos, hamsteres e cobaias devem ser lavadas e incubadas por 1 hora com uma solução de hipoclorito de sódio a 10%, seguida pela lavagem com detergente e enxague com água.

A lavagem dos bebedouros é realiza com auxílio de um sepilho. Os bicos dos bebedouros deverão permanecer de molho em água contendo hipoclorito por 30 min. a 1 hora.

A secagem do material será realizado ao lado da pia de lavagem em local já determinado.

No caso dos coelhos, deverão ser retirados quaisquer acúmulos de pêlo, fezes e urina das gaiolas. As bandejas dos coelhos deverão ser retiradas para lavagem, secas e depois forradas com jornal antes de serem colocadas novamente nas gaiolas.

SALA DE PROCEDIMENTOS E CIRURGIAS

A sala de procedimentos é de uso comum, portanto o uso da mesma, bem como do fluxo laminar ficam condicionados A RESERVA PRÉVIA DA ÁREA.

SERÁ TOLERADO UM ATRASO DE 15 MIN NO INÍCIO DAS ATIVIDADES NA ÁREA RESERVADA, APÓS O QUAL A RESERVA SERÁ CONSIDERADA CANCELADA E O SETOR DISPONIBILIZADO PARA OUTROS USUÁRIOS.

A SALA E O FLUXO DEVERÃO SER MANTIDOS RIGOROSAMENTE LIMPOS, DEVENDO SER LIMPOS ANTES E APÓS CADA PROCEDIMENTO.

O fluxo laminar e as bancadas devem ser limpos com álcool 70% antes e após sua utilização. Caso ocorra contaminação com microrganismos nesta áreas, limpar com solução de formol a 5% ou hipoclorito de sódio a 10% e comunicar IMEDIATAMENTE o técnico responsável, os coordenadores do biotéiro ou o docente responsável pelo projeto.

Os animais sacrificados ou mortos durante o procedimento devem ser acondicionados em sacos plásticos e armazenados em freezer para posterior descarte em lixeira apropriada, sendo posteriormente incinerados por empresas conveniadas com a Universidade.

DEVERÃO SER EVITADOS SACRIFÍCIOS ÀS 6ª FEIRAS OU DURANTE FINAIS DE SEMANA E FERIADOS, ESPECIALMENTE PROLONGADOS

Agulhas e outros materiais cortantes devem ser descartados nas caixas apropriados para materiais perfuro-cortantes.

ÁREA DE LAVAGEM E PREPARO

Os materiais (bandejas, bebedouros, rolhas) deverão ser deixados em tanques com hipoclorito de sódio a 10%, por uma hora, e lavados com detergente tensoativo biodegradável.

As tampas cromadas das caixas deverão ser esterilizadas em estufa a 180°C por 2hs.

Os bebedouros limpos deverão ser completados com água filtrada.

Os microisoladores passam pelo mesmo processo de lavagem e as caixas completas com tampa e bebedouro podem ser autoclavadas antes da re-utilização.

RECEBIMENTO DE ANIMAIS EXTERNOS

Nenhum animal poderá ser trazido ao Biotério de Experimentação Animal sem autorização prévia dos coordenadores e da chefia do departamento.

IDENTIFICAÇÃO DAS GAIOLAS EM EXPERIMENTAÇÃO

Serão fornecidas plaquetas para a identificação das gaiolas e nas fichas deverão constar as seguintes informações:

1. Identificação da linhagem
2. Identificação da idade dos animais (data de nascimento)
3. Sexo
4. Identificação do **usuário e docente responsável**
5. Identificação do material inoculado
6. Data do início do experimento

LOTAÇÃO DAS GAIOLAS

Espécie animal	Tamanho da gaiola	No. Máximo de Animais por gaiola
camundongos	30 x 18 x 13 cm	05
coelhos	45 x 60 x 40 cm	01
ratos/hamsteres	20 x 30 x 20 cm	03
cobaias	35 x 50 x 20 cm	04

ALIMENTAÇÃO E MEDICAMENTOS EXTRAS

Consumo de alimento e água por espécie

Espécie	Consumo de ração/100g de peso	Consumo de água/100g de peso
	(gr)	(ml)
Coelho	5	10
Cobaia	6	10
Hamster	10-12	8-10
Camundongo	15	15
Rato	10	10-12

É recomendável oferecer aos animais alimentos extras e alguns podem requerer medicações especiais, como vitaminas ou medicamentos para tratamento de sarna.

Espécie	Medicamentos contra sarna	Suplementos alimentares
Coelho	Acarsan Tetmosol Sarnapin	Folhas de beterraba ou couve/ Cenoura ou rama de cenoura
Rato	Acarsan Tetmosol Sarnapin	não
Cobaia	Acarsan Tetmosol Sarnapin	CEVIN (vitamina C)
Camundongo	não	não

V - VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DROGAS E INFECÇÃO

ORAL

Também conhecida como “Per Oz”, normalmente utilizada no tratamento de colônias ou grupos de animais. A principal vantagem dessa via é que o fármaco pode

ser adicionado, na maioria dos casos, na água de beber ou no alimento. Para tanto, deve estar na forma líquida de solução ou suspensão.

A absorção ocorre principalmente em nível de intestino delgado, que apresenta grande área de vascularização, podendo ocorrer pequena absorção em nível estomacal, se a droga estiver fortemente ionizada ou se forma de lípide.

ENDOVENOSA

A via endovenosa é utilizada para a administração de soluções, diretamente em circulação sanguínea e os níveis de concentração plasmática podem ser precisamente controlados, levando em consideração parâmetros como peso, idade e sexo. Soluções administradas devem ser neutras e não irritantes.

A via endovenosa pode ser utilizada tanto para administração de fármacos como infecção.

INTRAPERITONEAL

A via intraperitoneal pode ser utilizada para a administração de volumes relativamente grandes, sendo uma das vias mais utilizadas na experimentação animal.

Grande parte do produto administrado no peritônio é absorvida pela circulação portal, ficando sujeita a atividade metabolizante do fígado para depois dar acesso à circulação geral.

A via intraperitoneal pode ser utilizada tanto para administração de fármacos como infecção.

INTRAMUSCULAR

Pode ser utilizada para administração de pequenos volumes de drogas irritantes ao tecido, preparações que formam precipitados e que necessitem de absorção intermediária entre a obtida pela via endovenosa e a subcutânea.

As drogas são normalmente administradas intramuscularmente na forma de solução e suspensão aquosa ou oleosa.

SUBCUTÂNEA

É a via utilizada quando se deseja absorção mais lenta que a obtida intramuscular. Pequenos volumes não irritantes em veículo aquoso ou oleoso podem ser administrados subcutaneamente. Implantes na forma sólida também podem ser administrados na região subcutânea. O uso de adjuvante completo de Freund em coelhos pode levar ao aparecimento de áreas de necrose.

INTRADÉRMICA

É a administração de pequenas quantidades de soluções entre as camadas da pele. Essa via apresenta problema devido a relativa impermeabilidade das camadas da epiderme uma vez que a permeabilidade varia consideravelmente entre as espécies.

INTRANASAL

É a administração de pequenas quantidades de soluções através da narina dos animais. Esta via pode ser utilizada tanto para administração de fármacos como infecção.

Vias de inoculação por espécie

Espécie	Vias				
	PO	EV	IM	SC	IN
Coelhos	Ração ou tubo flexível	Veias do pavilhão auricular	Músculo da coxa	Flanco ou região traseira	Não aplica
Cobaias	Ração ou tubo flexível, agulha com ponta arredondada	Veias do pavilhão auricular, da coxa ou veia peniana	Músculo da coxa	Região traseira	Não aplica
Hamster	Ração, agulha com ponta arredondada	Veias femural ou jugular	Músculo da coxa	Região traseira ou dorsal	Não aplica
Camundongos ou Ratos	Ração, água, agulha com ponta arredondada	Veias caudal, sublingual ou subcávia	Músculo da coxa	Região dorsal, dorso lateral, coxim plantar.	Narinas

PO= Oral

EV=Endovenosa

IM=Intramuscular

SC=subcutânea

IN=Intranasal

Volume máximo (ml) para administração de drogas em animais adultos

Espécie	Vias				
	Subcutânea	Intramuscular	Intraperitoneal	Intravenosa	Intranasal
Camundongo	2,0	0,05	2,0-3,0	veia caudal- 0,2	0,05
Rato	5,0	0,3	5,0-10,0	veia caudal e peniana- 0,5	0,05 – 0,1
Hamster	3,0	0,1	3,0-4,0	veia femural ou jugular- 0,3	Não aplica
Cobaia	5,0	0,5-1,0	10,0-15,0	Veia do pavilhão auricular e safena- 0,5	Não aplica
Coelho	30,0	1,0	50,0-100,0	veia marginal- 1,0-5,0	Não aplica

VI - COLETA DE SANGUE

A escolha da técnica depende da espécie animal, volume requerido, da frequência da coleta e do tipo de anestésico a ser utilizado. Nos experimentos que requerem a sobrevivência dos animais, **a amostra coletada não deve exceder a 10% do volume total de sangue que corresponde a 6% de seu peso.**

RETRO-ORBITAL

A sangria pelo plexo retro-orbital é realizada para coleta de pequenos volumes em camundongos, ratos e hamsteres. O animal pode ser sedado com éter. O uso de outros anestésicos pode comprometer a pressão arterial do animal, assim dificultando a coleta de sangue.

VENOSECÇÃO

É a coleta de sangue por secção de vasos sanguíneos superficiais. Os vasos localizados na região caudal de ratos, camundongos e hamsteres são normalmente recomendados. O procedimento causa desconforto para o animal.

VENOPUNÇÃO

É a obtenção de sangue diretamente do sistema circulatório em volumes maiores que as obtidas por venosecção. Geralmente é utilizada para coleta de sangue em coelhos através das veias marginal e central do pavilhão auricular. Os coelhos devem ser imobilizados em caixa especial de contenção. A veia caudal pode ser utilizada para coleta de sangue em camundongos ou ratos. Os animais podem ou não serem anestesiados.

PUNÇÃO CARDÍACA

Normalmente utilizada para obtenção de grandes volumes de sangue. É uma coleta final, pois o animal normalmente é sacrificado após este tipo de procedimento.

Após a anestesia, o animal deve ser colocado em uma superfície plana, em decúbito lateral direito e a agulha inserida em um ângulo de 10 a 30° acima do abdômem, lateralmente ao processo xifóide. Dependendo da espécie, outros sítios anatômicos podem ser utilizados como: veia safena, veia jugular, veia femoral, veia peniana, veia cefálica e a veia sublingual.

CALIBRE DAS AGULHAS A SEREM UTILIZADAS

25 x 8	}	Inoculações e sangrias	40 x 9 (punção cardíaca)
30 x 7			
30 x 8			

VII - ANESTÉSICOS

PRÉ-ANESTÉSICOS: tem a função de reduzir o estresse e a dor, diminuir a dose do agente anestésico, induzir à recuperação suave da anestesia e reduzir as secreções.

1. **Atropina:** Reduz secreções salivares e brônquicas: promove discreta taquicardia sendo indicada no preparo dos animais tratados com xilazina e fantanil.
2. **Acepromazina, clorpromazina e levopromazina:** Promovem tranquilização sem, no entanto, levarem ao sono; potencializam a ação dos anestésicos reduzindo sua dose e aumentando seu tempo de ação. Causam redução da temperatura corpórea, hipotensão moderada e taquicardia reflexa.
3. **Diazepam e midazolam:** Promovem sedação e relaxamento muscular. Geralmente são associados aos anestésicos dissociativos como quetamina e tiletamina.

4. **Xilazina:** Potente sedativo; proporciona analgesia visceral e excelente relaxamento muscular; pode causar depressão respiratória e redução dos batimentos cardíacos.

5- **Opióides (fentanil, meperidina):** Excelentes analgésicos que promovem sedação moderada. Em doses elevadas causam depressão respiratória e diminuição da frequência cardíaca. Podem ser associados a tranquilizantes propiciando neuroleptoanalgesia (fentanil-droperidol).

ANESTÉSICOS:

1. **Anestésicos dissociativos (quetamina e tiletamina):** Isoladamente, promovem apenas imobilização, acompanhada de rigidez muscular. Em doses rotineiras, induzem analgesia superficial (pele, musculatura), aumentam a secreção salivar, indicam a administração prévia de atropina e mantêm reflexos protetores presentes não permitindo adequada monitorização da anestesia. Para atenuar seus efeitos colaterais, a quetamina deve ser associada a xilazina ou aos benzodiazepínicos (diazepam e midazolam). A tiletamina já se apresenta no mercado associada ao benzodiazepínico denominado zolazepam.

2. **Barbitúricos (pentobarbital e tiopental):** São agentes hipnóticos que induzem desde simples sedação até anestesia geral. O pentobarbital tem tempo de ação entre 30 e 90 minutos dependendo da espécie animal e da via de administração (intravenosa ou intraperitoneal). O tiopental promove anestesia durante o período de 10 a 15 minutos e deve ser administrado exclusivamente pela via intravenosa. São importantes depressores da respiração. Não são bons analgésicos porém, excelentes miorrelaxantes. ATUALMENTE O SEU USO É DIFÍCIL DEVIDO A RESTRIÇÕES EM ADQUIRIR A DROGA.

3. **Éter etílico:** Agente inflamável e explosivo facilmente vaporizado. Irritante de mucosas: pode causar tosse, aumento de secreções salivares e brônquicas, obstrução das vias aéreas, edema pulmonar, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial. Pode ser administrado facilmente colocando-se o animal em cuba de vidro contendo algodão embebido com o agente anestésico. PODE SER UTILIZADO PARA COLETA DE SANGUE RETRO-ORBITAL EM CAMUNDONGOS.

4. **Anestésicos halogenados (halotano, metoxifluorano):** O halotano é um dos agentes inalatórios mais utilizados em anestesia veterinária. No entanto, seu uso não

é rotineiro em animais de experimentação devido ao alto custo, necessidade de equipamento adequado, bem como técnico especializado. Não são irritantes de mucosas, porém promovem depressão cárdio-respiratória. Não são explosivos e nem inflamáveis.

MONITORAÇÃO ANESTÉSICA:

Os sinais de anestesia compreendem os reflexos de endireitamento, interdigital, pinçamento da cauda, corneal e palpebral. Existem 3 planos de anestesia:

- a) superficial
- b) médio
- c) profundo

No **plano de anestesia superficial** todos os reflexos ainda estão presentes.

A maior parte dos procedimentos cirúrgicos é realizada, no **plano de anestesia médio**, exceção feita às intervenções nas cavidades abdominal e torácica, reservadas ao plano profundo.

Na anestesia média, os reflexos interdigital, de pinçamento e palpebral podem estar ausentes. Com éter, esse reflexo torna-se ausente antes do reflexo interdigital em camundongos e coelhos.

No **plano de anestesia profunda** o reflexo corneal geralmente está ausente.

Drogas pré-anestésicas comumente utilizadas em animais de laboratório

Droga	Dosagens por espécie e vias de administração			
	Camundongo	Rato	Hamster	Coelho
Atropina	0,05mg/kg SC	0,05 mg/kg SC	0,04 mg/kg SC, IP ou IM	1-3 mg/kg SC ou IM
Acepromazina	2,5 mg/kg SC	2,5 mg/kg SC	5 mg/kg SC	1 mg/kg SC
Diazepam	5 mg/kg IP	2,5 mg/kg IP	5 mg/kg IM	2 mg/kg IM ou EV
Xilazina	10 mg/kg IP	10 mg/kg IP	10 mg/kg IP	5 mg/kg IM
Opióides	0,33 mg/kg IM	0,4 mg/kg IM	0,5 mg/kg IM	0,3 mg/kg IM
Clorpromazina	25-40 mg/kg IM	-	-	7,5 mg/kg - IV ou 25-100mg/kg - IM

Drogas anestésicas comumente utilizadas em animais de laboratório

Droga	Dosagens por espécie e vias de administração				
	Camundongo	Rato	Hamster	Coelho	Cobaías
Fentanil droperidol	-	2ml/kg IM	1,2ml/100mg IM	0,2 mg/kg IM	
Pentobarbital	45mg/kg IP	45mg/kg IP	50-90 mg/kg IV	30-45 mg/kg IV	37 mg/kg IP
Quetamina	200mg/kg IP	100mg/kg IP	200 mg/kg IP	50 mg/kg IM	100 mg/kg IP
Quetamina + acepromazina	150 mg/kg IP 5 mg/kg IP	100 mg/kg IP 2,5 mg/kg IP	150 mg/kg IP 5 mg/kg IP	50 mg/kg IP 1 mg/kg IP	125 mg/kg IP 5 mg/kg IP
Quetamina + diazepan	150 mg/kg IP 5 mg/kg IP	75 mg/kg IP 5 mg/kg IP	70 mg/kg IP 2 mg/kg IP	25 mg/kg IP 5 mg/kg IP	125 mg/kg IP 5 mg/kg IP
Quetamina + xilazina	100 mg/kg IP 10 mg/kg IP	90 mg/kg IP 10 mg/kg IP	200 mg/kg IP 10 mg/kg IP	35 mg/kg IP 5 mg/kg IP	40 mg/kg IP 5 mg/kg IP
Tiopental	30-40 mg/kg IV	30 mg/kg IV	-	30 mg/kg IV	-
Xilazina	50 mg/kg IM	10 mg/kg IP	10 mg/kg IP	5 mg/kg IM	5 mg/kg IP

Parâmetros fisiológicos de animais de laboratório – valores em animais adultos

Espécie	Frequência Cardíaca (bat/min)	Frequência Respiratória (mov/min)	Volume Sanguíneo (ml/min)	Peso vivo (g)	Temperatura corpórea (°C)
Camundongo	327-780	90-160	0,09-0,023	20-40	37,4
Rato	250-450	70-115	0,6-2,0	250-520	38
Hamster	250-500	40-130	0,4-1,4	85-150	37,4
Cobaia	230-280	40-100	2,3-5,3	700-1200	38
Coelho	130-330	30-60	4-6	2000-6000	38

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

Princípio ativo	Nome comercial	Laboratório	Apresentação
Atropina	Sulfato de atropina	Apsen	0,25mg/ml
Acepromazina	Acepran 0,2%	Univet	2,0mg/ml
Clorpromazina	Amplictil	Rhodia	25mg/5ml
Levomepromazina	Neozine	Rhodia	25mg/5ml
Diazepam	Valium	Roche	5mg/ml
Midazolam	Dormonid	Roche	15mg/3ml
Xilazina	Rompum	Bayer	20mg/ml
Fentanil	Fentanil	Johnson&Johnson	0,05mg/ml
Meperidina	Dolantina	Hoescht	50mg/ml
Fentanil-droperidol	Inoval	Johnson&Johnson	
Quetamina	Ketalar	Parke-Davis	50mg/ml
Tiletamina-zolazepam	Zoletil	Virbac	50mg/ml
Tiopental	Thionembutal	Abbott	0,5 e 1,0 g
Pentobarbital	Hypnol	Cristália	30mg/ml
Éter	Éter anestésico	Rhodia	Frasco 140 ml
Halotano	Halotano	Hoescht	Frasco 50, 100 e 250 ml
Metoxiflurano	Pentrane	Abbott	Frasco 100 ml

VIII - EUTANÁSIA

MÉTODO FÍSICO

Deslocamento cervical (utilizar somente em condições especiais onde os métodos químicos não pode ser utilizados – é obrigatório justificar a utilização deste método).

MÉTODO QUÍMICO

Dióxido de Carbono (líquido, gasoso ou em forma de gelo seco):

Dos métodos de eutanásia por inalação, o CO₂ é mais recomendado para pequenos roedores de laboratório.

Para sua utilização devemos contar com uma câmara previamente preenchida pelo gás puro, ou preferencialmente, adicionado de 30% de oxigênio, para reduzir a ansiedade decorrente do desconforto da hipoxia, durante a fase de indução da eutanásia dos animais.

Quando se emprega CO₂ sob a forma de gelo seco, esse se transforma rapidamente em gás (pela adição de água), mas deve-se considerar que ao contato direto pode causar queimaduras, que podem ser evitadas com a utilização de uma tela de arame para revestimento do fundo do recipiente.

Em virtude do fato de o CO₂ ser uma vez e meia mais pesado que o ar, concentra-se na parte inferior do recipiente que o contém, portanto a abertura da câmara deve ser localizada na parte superior. Esse gás é letal por provocar depressão do sistema nervoso central. Recomenda-se manter os animais na câmara por mais 10 minutos, para confirmação de sua morte.

Anestésicos Inalantes:

Substâncias voláteis, tais como éter, são administrados por inalação, e tem capacidade de provocar irritação de mucosas das vias respiratórias, induzir à salivação excessiva e aumentar a secreção brônquica. Determinam parada respiratória. NÃO É ACONSELHADA A UTILIZAÇÃO DESTA VIA.

Anestésicos não-inalantes:

Pentobarbital sódico e derivados:

A via endovenosa é a mais adequada para administração deste barbitúrico, porém outras vias também podem ser utilizadas com retardo de tempo do efeito.

Ratos 100mg/kg IP

Hamsters 80-150mg/kg IP

Coelhos 200mg/kg IV

Ketamina:

Quando em combinação com outras drogas (Zilazina, Benzodiazepínicos), também é uma opção apropriada para eutanásia. Normalmente utiliza-se o triplo da dose anestésica.

IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ROSÁLIA REGINA DE LUCA, SANDRA REGINA ALEXANDRE, THAIS MARQUES, NÍVEA LOPES DE SOUZA, JOSÉ LUIS BERNARDINO MERUSSE, SILVÂNIA PERIS NEVES. Manual para técnicos em bioterismo. São Paulo: Winner Graph, 1996.

SANDRA REGINA ALEXANDRE. Manual de normas técnicas: biotério de experimentação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2. ed. – São Paulo: Biocopy, 2003.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guide to the care and use of experimental animals. Ontário: CCAC, 1984.

Normas técnicas do Biotério de Experimental Animal do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (aprovadas em CD de 30 de março de 1998).