

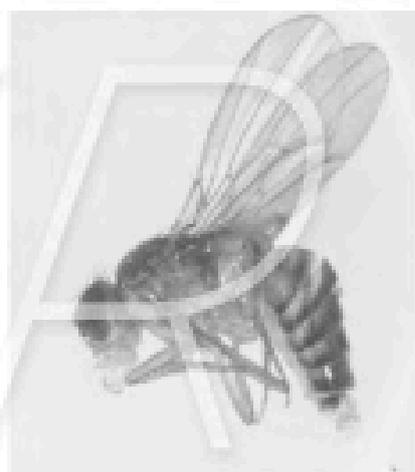
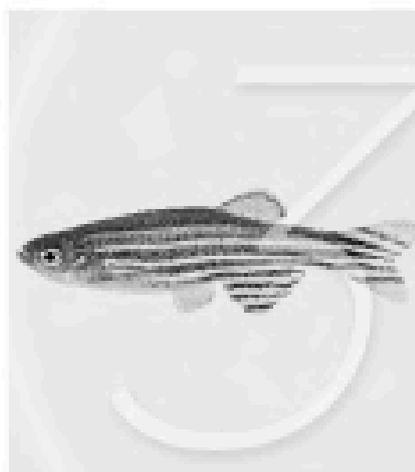
BIOÉTICA E MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Eduardo Carvalho Lira
(Organizador)



BIOÉTICA E MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Eduardo Carvalho Lira
(Organizador)



Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Bruno Oliveira

Camila Alves de Cremonesi

2022 by Atena Editora

Luiza Alves Batista

Copyright © Atena Editora

Natália Sandrini de Azevedo

Copyright do texto © 2022 Os autores

Imagens da capa

Copyright da edição © 2022 Atena Editora

iStock

Direitos para esta edição cedidos à Atena

Edição de arte

Editora pelos autores.

Luiza Alves Batista

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Biológicas e da Saúde**

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto

Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí

Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco



Bioética e manejo de animais de laboratório

Diagramação: Camila Alves de Cremona
Correção: Mariane Aparecida Freitas
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizador: Eduardo Carvalho Lira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B615 Bioética e manejo de animais de laboratório /
Organizador Eduardo Carvalho Lira. – Ponta Grossa
- PR: Atena, 2022.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-258-0130-8

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.308221909>

1. Animais de laboratório. 2. Bioética. I. Lira,
Eduardo Carvalho (Organizador). II. Título.

CDD 636.0885

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.arenaeditora.com.br
contato@arenaeditora.com.br



Atena
Editora
Ano 2022

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.



DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.



Nossos agradecimentos ao Prof. Msc. Joel Majerowicz pela gentileza em dedicar parte do seu tempo a realizar a correção técnica do manuscrito desta obra.

PREFÁCIO

Este livro nasceu do anseio de expandir conceitos sobre a ciência de animais de laboratório para os que iniciam suas carreiras acadêmico-científicas, promovendo o respeito e o bem-estar para com animais utilizados na experimentação científica. Essa semente sobre a importância do Bioterismo, lançada pela Professora Dr.^a Adela Rosenkranz através da formação de recursos humanos na América Latina reverberou no Nordeste do Brasil. Portanto, este livro é uma sinopse dos cursos de formação de alunos de pós-graduação e graduação, ao longo dos últimos dez anos, sobre Bioética e manejo de animais de laboratório que é ministrado pelo Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Iniciamos com um breve histórico sobre a utilização de animais para fins experimentais/didáticos, desde os primórdios da ciência, o que é amplamente questionado e discutido por correntes filosóficas antagônicas, que se posicionam na negativa absoluta baseada na suposição de maus tratos, ou aquelas favoráveis a utilização de animais como meio para o desenvolvimento tecnológico. Este preâmbulo é uma forma de aguçar a curiosidade do leitor e conduzi-lo aos capítulos seguintes nos quais são abordados a legislação brasileira para o uso de animais, os conceitos de biossegurança na experimentação animal, as principais espécies utilizadas na pesquisa experimental, os aspectos da fisiologia de ratos e camundongos e os métodos de colheita das amostras biológicas. Neste sentido, esta obra busca contribuir com o debate qualificado e focado no uso legal, ético como meio para encontrar soluções para diferentes problemas de saúde que afetam os animais, inclusive os humanos. Portanto, este livro é um preparo para aqueles que buscam a carreira científica, nas áreas das ciências biomédicas, mas também para aqueles que desejam ser informados dos conceitos atuais do bem-estar animal.

Glória Isolina Boente Pinto Duarte

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NA PESQUISA CIENTÍFICA – BREVE HISTÓRICO Glória Isolina Boente Pinto Duarte  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219091	
CAPÍTULO 2.....	5
BIOÉTICA: REGULAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM PESQUISA José Jairo Teixeira da Silva  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219092	
CAPÍTULO 3.....	12
PRINCIPAIS ESPÉCIES ANIMAIS UTILIZADAS EM PESQUISA EXPERIMENTAL Glória Isolina Boente Pinto Duarte  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219093	
CAPÍTULO 4.....	19
ASPECTOS GERAIS DA FISIOLÓGIA DO RATO E CAMUNDONGO DE BIOTÉRIO Eduardo Carvalho Lira  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219094	
CAPÍTULO 5.....	27
ASPECTOS REPRODUTIVOS GERAIS DE RATOS E CAMUNDONGOS Dayane Aparecida Gomes Ismaela Maria Ferreira de Melo  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219095	
CAPÍTULO 6.....	34
ANESTESIA, ANALGESIA E EUTANÁSIA DE ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO Ismaela Maria Ferreira de Melo  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219096	
CAPÍTULO 7.....	49
BIOSSEGURANÇA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL Leucio Duarte Vieira  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219097	
CAPÍTULO 8.....	60
MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS MAIS UTILIZADAS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL Valéria Nunes de Souza  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219098	
CAPÍTULO 9.....	72
MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE MAMÍFEROS EM PESQUISA EXPERIMENTAL Samara Rodrigues Bonfim Damasceno Oliveira  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219099	
SOBRE OS ORGANIZADORES	88

CAPÍTULO 8

MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS MAIS UTILIZADAS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Data de aceite: 01/03/2022

Valéria Nunes de Souza

Profa. Dr.^a Universidade Federal de Pernambuco

INTRODUÇÃO

Toda amostra biológica está sujeita a diversas variações, as quais refletem diretamente nos resultados, sejam elas biológicas, pré-analíticas ou analíticas. Além de saber como e as diferentes maneiras de administração de substâncias e coleta de material biológico, o escopo do presente capítulo destaca a importância de evitar tais variações para obtenção de uma amostra de qualidade.

A variação biológica é aquela causada por alterações nas condições de alojamento e experimentação animal. Quando se pensa na qualidade da amostra biológica, estas condições podem representar tanto um grande aliado quanto um inimigo. Os roedores são muito susceptíveis às variações das condições de manutenção. Nesse sentido, o ciclo claro-escuro, a temperatura, a umidade, a frequência de limpeza e os sons no biotério constituem como os principais parâmetros que devem ser controlados para evitar o estresse do animal, pois isso pode modificar respostas fisiológicas e, conseqüentemente, a amostra a ser coletada, o que resulta em erros de interpretação, invalidação dos resultados e comprometimento da pesquisa.

A variação pré-analítica é aquela causada durante a experimentação *in vivo*, nos processos de administração de substâncias e coleta de amostras biológicas, decorrentes, principalmente, de falta de treinamento prévio, falta de padronização, utilização de material inadequado na coleta, identificação incorreta das amostras, demora no processamento das amostras

e no armazenamento inadequado.

A variação analítica constitui variações durante o processamento (ensaios) da amostra biológica. São decorrentes de erros no preparo das amostras (Ex.: diluição incorreta, contaminação), na preparação de reagentes, erros de pipetagem, utilização de equipamentos não calibrados ou em manutenção precária, e até mesmo erro nas análises dos dados (Ex.: erro de digitação, análise estatística incorreta).

MÉTODOS DE COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS EM ROEDORES

Sangue

O sangue é uma das amostras biológicas mais coletadas na experimentação animal e pode ser obtido de diversas maneiras a depender do tamanho e saúde do animal, da qualidade e quantidade do sangue e da frequência de coleta. Tais parâmetros definirão se a coleta deverá ser realizada no animal contido ou anestesiado. Além disso, deve-se considerar a influência do anestésico no parâmetro a ser analisado na amostra coletada.

De um modo geral, a coleta de sangue exerce um impacto negativo, principalmente quando realizada sem anestesia, visto ser um procedimento invasivo e doloroso associado aos efeitos da perda de sangue. É importante frisar que, a depender do método de coleta, a amostra biológica pode ser contaminada pelo contato com pele e pelos dos animais. Nesse sentido, antes de determinar a quantidade de sangue que pode ser coletada de um roedor, é necessário saber quanto de volume sanguíneo total ele possui e quanto pode ser coletado sem causar alterações clínicas relevantes. Para tanto, pode-se determinar o volume total de sangue circulante a partir do peso corporal do roedor. Assim, como representativo

do volume de sangue total, calcula-se 10% do peso corporal dos ratos e 6-8% dos camundongos. Desta forma, ratos adultos, com peso corporal de 250mg, possuem ~25mL de sangue total circulante. O volume a ser coletado deve ter como base, além do volume total circulante, o intervalo de recuperação após a coleta, visto que o volume do sangue é recuperado em 24 horas, porém os eritrócitos retornam aos níveis normais somente em duas semanas, em função do tempo necessário para a eritropoiese. Assim, em regras gerais, para a coleta de sangue tem-se:

- Volume máximo aceitável de 10% do volume de sangue circulante de um roedor adulto/duas semanas;
- Coletas frequentes não exceder 7,5% do volume de sangue circulante/semana;
- Regra de ouro: <1% do volume de sangue circulante/dia.

Após centrifugação do sangue total coletado, obtém-se ~55% de plasma (fase superior), <1% de leucócitos e plaquetas (fase intermediária) e ~45% de eritrócitos (fase inferior). Sugere-se como parâmetro para centrifugação do sangue: 3.000 a 4.000 rpm, durante 10 a 15 minutos a 4 ± 2 °C. Para a obtenção de plasma, coleta-se o sangue total em um tubo contendo anticoagulante (Ex.: heparina, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ou citrato de sódio). Por outro lado, para obter soro, o sangue total é coletado em tubo sem anticoagulante e deixado à temperatura ambiente durante 30 minutos para formar o coágulo de sangue ou utiliza-se tubo contendo ativador de coágulo.

Veia caudal

A obtenção de sangue pela veia caudal não necessita de anestesia e é preferível quando se deseja a coleta de pequenos volumes sanguíneos, como, por exemplo, para a mensuração da glicemia com glicosímetro. Quando realizada em ratos, após a devida assepsia com etanol 70%, um pique com agulha (22-23G) no final da cauda é suficiente para se obter pequenas gotas de sangue, as quais podem ser utilizadas diretamente na mensuração glicêmica ou coletadas, com capilar, para serem centrifugadas e utilizadas posteriormente.

Em camundongos, um pequeno corte (1mm) da extremidade final com tesoura bem amolada é preferível ao pique com agulha para a coleta sanguínea (Figura 1). Lateralmente na cauda, as veias são bastante visíveis em roedores albinos e tornam-se ainda mais visíveis quando da indução do aumento do fluxo sanguíneo por imersão da cauda em um recipiente contendo água morna (38-39 °C) por 10 segundos (Figura 1), o que permite a coleta de um volume maior. Entretanto, para uma coleta lateral faz-se necessário a contenção do roedor em contensor de tamanho adequado. Na ausência de um contensor específico para camundongos, pode-se cortar a extremidade de um tubo tipo "Falcon" de 50mL e utilizá-lo, conforme mostra a figura 1. Na sequência a assepsia da cauda com etanol 70%, introduz-se uma agulha (23G-26G) para a realização da coleta. Pode-se ainda utilizar um capilar para coletar o sangue diretamente do bulbo da agulha. Após finalizar a coleta, comprima uma gaze seca e estéril no local para parar o sangramento, assegurando-se da hemostasia antes de retornar o animal para a gaiola. A figura 1 mostra a contenção do roedor em contensor, bem como a coleta sanguínea através da veia caudal.

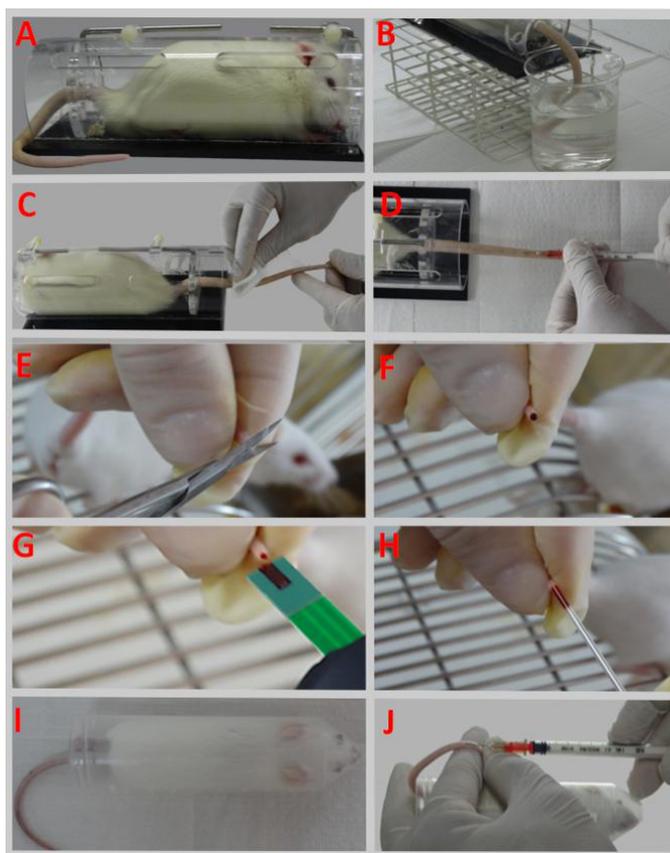


Figura 1 – Coleta sanguínea através da veia caudal.¹

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Veia safena

Permite a obtenção repetida de um pequeno ou médio volume sanguíneo sem anestesia, porém a contenção do roedor é requerida. Para a coleta através da veia safena, localizada na superfície externa da coxa (Figura 2), deve-se raspar o pelo da área e fazer uma compressão descendente suave pouco acima do joelho, na base da perna, para a melhor visualização da veia. Esta é puncionada com agulha 20G. Após a coleta, comprima uma gaze estéril no local da punção para parar o sangramento.

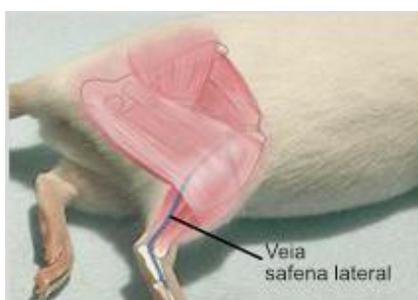


Figura 2 – Veia safena lateral.

Fonte: http://www.theodora.com/rodent_laboratory/blood_collection.html.

¹ A: Rato em contensor; B: Imersão da cauda em um recipiente contendo água morna (38-39 °C); C: Assepsia da cauda com etanol 70%; D: Coleta sanguínea através da veia caudal em rato; E: Pequeno corte (1 mm) da extremidade final da cauda de camundongo; F: Saída de sangue após corte da extremidade da cauda; G: Coleta de sangue para mensuração de glicemia com glicosímetro; H: Coleta de sangue da extremidade da cauda com capilar heparinizado; I: Contenção de camundongo em tubo tipo "Falcon" de 50mL; J: Coleta sanguínea através da veia caudal em camundongo.

Veia facial

Permite a obtenção de médio ou grande volume sanguíneo sem anestesia, porém com contenção do roedor. Após a assepsia, punciona-se com agulha (22-25G) a região atrás da marca localizada na bochecha do animal (marca do masseter – seta vermelha - Figura 3) e coleta-se o sangue em tubo ou capilar heparinizado. Para estancar o sangramento utiliza-se uma gaze estéril para comprimir o local da punção, o qual fechará em 1 minuto.

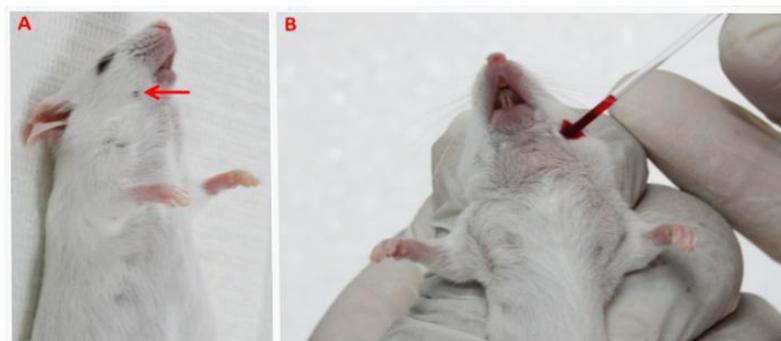


Figura 3: Coleta sanguínea através da veia facial. A: Marca do masseter (seta vermelha), local onde deve ser puncionado para coleta de sangue; B: Coleta de sangue com tubo capilar heparinizado.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Retro orbital

Permite a obtenção de grande volume sanguíneo com boa qualidade. Entretanto, necessita de anestesia além da contenção do animal. A anestesia pode ser local (oftálmica) ou geral com efeito de duração rápida, uma vez que o procedimento é rápido de realizar. Essa técnica só deve ser realizada por operador bem treinado, pois pode-se causar cegueira no animal. O seio venoso retro orbital localiza-se abaixo da membrana conjuntival. Assim, com uma pipeta Pasteur ou capilar deve-se inserir no canto do olho (seta vermelha – Figura 4) em um ângulo de 45° com movimento rotacional suave avançando o tubo através da membrana conjuntival, conforme mostra a figura 4, o sangue fluirá por capilaridade. Após a coleta, comprima uma gaze estéril no local para parar o sangramento, com cuidado para não arranhar a córnea.

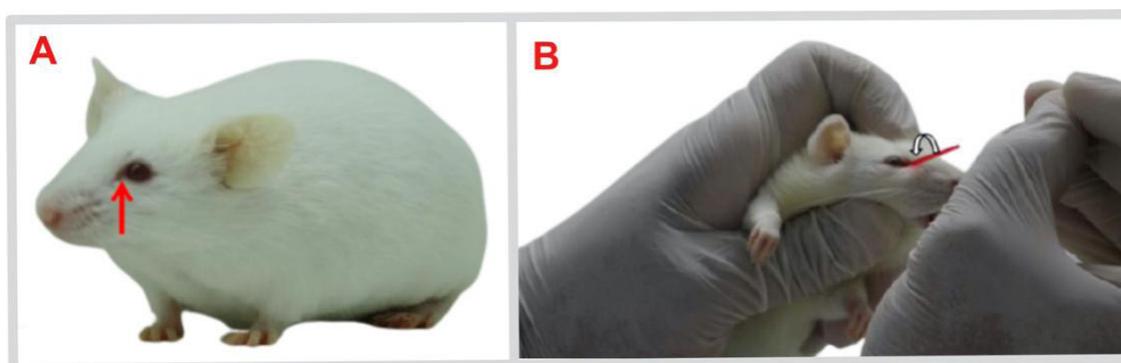


Figura 4 – Coleta sanguínea via retro orbital. A: Localização para penetração do capilar; B: Penetração no canto do olho em um ângulo de 45° girando levemente

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Veia jugular

O método deve ser realizado com o roedor anestesiado e com o pescoço e a cabeça na posição distendida (para trás), posição de melhor visualização das veias jugulares, as quais são encontradas lateralmente à junção

esternoclavicular. A região do pescoço deve ser depilada ou molhada com etanol 70%. A agulha (25G) é inserida na veia de 1-3 mm de profundidade (direção caudocefálica) e o sangue coletado lentamente com a agulha imóvel. Após a coleta, aplica-se uma pressão com o dedo para parar o sangramento.

Punção cardíaca

Este procedimento permite a coleta de uma grande quantidade de sangue, requer anestesia profunda e só deve ser realizado quando da eutanásia do roedor. Após anestesia e verificação de ausência de movimentos espontâneos e resposta a estímulos, a região do tronco deve ser esterilizada com etanol 70% para localização do processo xifoide. Em um ângulo de 45°, insere-se uma agulha (20-23G com seringa de 1-5mL), com o bisel voltado para cima e levemente inclinada para esquerda da linha média logo abaixo da cartilagem xifoide, aspira-se lentamente com pressão constante e observa-se o sangue fluir, o que indica que o coração foi alcançado (Figura 5). Em caso positivo, puxa-se o êmbolo devagar e sem mover a seringa. O sangue fluirá com facilidade. Após encher a seringa, caso seja necessário mais volume de sangue, retire-a com cuidado deixando a agulha no local, esvazie a seringa em tubo e reconecte-a novamente na agulha para continuar a coleta. Caso não tenha acertado o coração, puxe um pouco a agulha sem retirá-la completamente da região torácica, mude um pouco a angulação e introduza novamente. Se ainda assim o sangue não fluir, faça uma pequena incisão abaixo da cartilagem xifoide (na linha média), pince-a e eleve-a de tal forma que consiga visualizar o coração através do diafragma, afaste delicadamente o fígado inferiormente caso ele esteja atrapalhando a visão do diafragma, agora ficará mais fácil a inserção da agulha e aumenta a chance de sucesso da punção. Imediatamente após a coleta o roedor deve ser eutanasiado. Para isso, abra rapidamente a região do tronco e rompa o diafragma.



Figura 5: Punção cardíaca. A: Punção cardíaca em rato com cavidade fechada; B: Punção cardíaca em rato após incisão abaixo da cartilagem xifoide (na linha média) e visualização do coração através do diafragma.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Decapitação

Não necessita anestesia em roedores pequenos, porém acima de 250g, a anestesia é requerida para evitar estresse na contenção. Permite obtenção de grande volume sanguíneo. Utiliza-se de um equipamento especial, tipo guilhotina, a qual deve estar bem afiada, a fim de realizar a decapitação de uma vez, evitando assim o sofrimento do animal. Imediatamente após a decapitação, deve-se coletar o sangue que “jorra” da região

cervical decapitada com um tubo tipo “ependorf®”. Uma desvantagem dessa técnica é a possível contaminação do sangue com o pelo e a pele do roedor.

TECIDOS

Conhecer a anatomia e fisiologia do animal é fundamental para realizar uma coleta tecidual fidedigna. Nesse sentido, sugere-se a leitura do capítulo que trata de aspectos fisiológicos de rato e camundongo. Um ponto importante a ser destacado, quando se trata da coleta de órgãos, é a retirada das influências adjacentes de outros tecidos, geralmente o tecido adiposo, como mostrado na Figura 6, uma vez que influenciará em análises gerais, como massa tecidual, bem como em análises mais sofisticadas, como as moleculares (expressão gênica e proteica). Abordaremos neste tópico alguns cuidados essenciais durante a coleta de tecidos.

Independentemente do tipo de amostra biológica, a coleta deve ser realizada da forma mais asséptica possível e os materiais descartáveis utilizados (ex.: agulhas, seringas, tubos) devem ser novos e/ou esterilizados. Os órgãos devem ser coletados e armazenados imediatamente após a eutanásia dos animais, para evitar que as reações *post mortem* interfiram nas análises a serem realizadas. Para tanto, utilize gelo seco ou nitrogênio líquido para o congelamento rápido de tecidos e/ou fluidos até o armazenamento em freezer -20 ou -80°C.

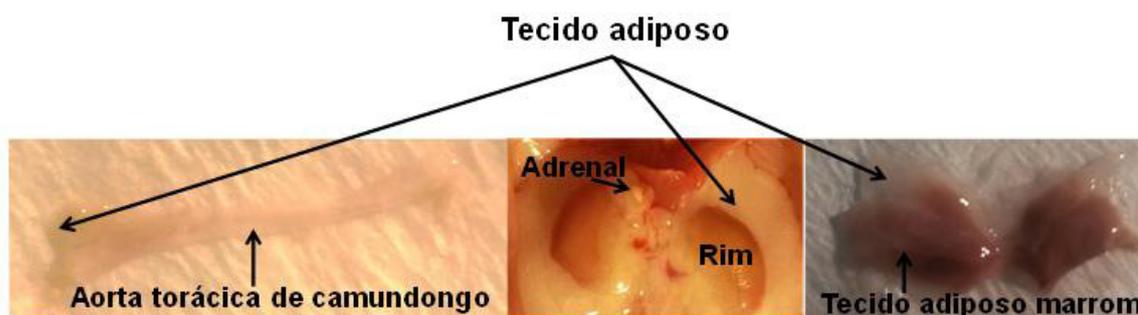


Figura 6: Tecido adiposo circundando a aorta torácica, os rins, a adrenal e o tecido adiposo marrom de camundongos.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Na coleta de tecidos destinados a análises histológicas, o fragmento deve ter de 0,5cm a 1,0cm de espessura. O frasco de coleta contendo a solução pré-fixadora (proporção tecido/pré-fixador de 1:10 ou 1:20) deverá ser de boca larga, preenchido totalmente com a solução e vedado até o processamento (tempo máximo nessa solução de 16-24h, na sequência, conservar em etanol 70% até a inclusão em parafina). Utiliza-se frasco de penicilina, coletor universal e até mesmo tubo para centrifugação tipo “Falcon” para este armazenamento com pré-fixador. Dentre as soluções pré-fixadoras têm-se o formol 10%; a formalina tamponada a 10% (uma vez que o ácido fórmico é uma impureza nociva à fixação dos tecidos, sugere-se a neutralização); a solução de “Bouin” (composto por ácido pícrico, ácido acético e formaldeído). Utiliza-se um Crioprotetor, do inglês *Optimal Cutting Temperature* (OCT) nos tecidos coletados para uma variedade de análises, como imunohistoquímica ou para detecção enzimática *in situ*. O OCT evita o ressecamento do tecido a temperaturas baixas, reduz a formação de cristais de gelo e minimiza os danos morfológicos, além de fornecer uma matriz para as amostras facilitando a execução de cortes a temperaturas $\leq -10^{\circ}\text{C}$, em criostato.

Na coleta de tecidos para as análises de biologia molecular (gênicas, proteicas, enzimáticas), os cuidados devem ser redobrados, principalmente, com relação ao tempo entre coleta e armazenamento, visto que as reações químicas são bastante rápidas e quanto mais tempo se passa na coleta, maior a chance de erro e resultados falsos negativos para o parâmetro a ser analisado. Nesse sentido, o congelamento deve ser imediato. Se o tecido será utilizado para análise gênica é importante frisar a necessidade de utilizar tubos livres de RNases, Dnases, as quais degradam o RNA e DNA e são resistentes a diversos tratamentos, inclusive térmicos. Além

disso, durante o experimento utiliza-se soluções preparadas com água contendo dietilpírocarbonato (DEPC), um inibidor de RNase.

Na coleta de tecidos, independentemente do tipo de experimento, deve-se evitar o congelamento/descongelamento das amostras biológicas (tecidos e fluidos), visto que causa ativação e inativação de enzimas e, conseqüentemente, a degradação da amostra, inviabilizando-a. Nesse sentido, sugere-se o armazenamento (-80°C) de fluídos em alíquotas e diversos pequenos cortes para os tecidos, dependendo da quantidade de experimentos que se deseja realizar. Sugere-se ainda que as extrações (gênicas e proteicas) das amostras sejam realizadas dentro de um ano, e que na extração proteica utilize-se tampão de lise celular contendo inibidores de proteases e fosfatases.

FEZES E URINA

A coleta não invasiva de urina e fezes necessita de gaiola metabólica. Entretanto, uma alternativa para coleta dessas amostras é durante a eutanásia. As últimas fezes, próximo ao reto (círculo vermelho – Figura 7A), podem ser coletadas para análise, uma vez que são fezes prontas para excreção. A coleta pode ser feita “empurrando” as fezes em direção ao reto com a ajuda de uma pinça. Logo após a eutanásia do roedor, a urina pode ser coletada com uma seringa diretamente da bexiga, caso esta contenha urina (círculo vermelho – Figura 7B).

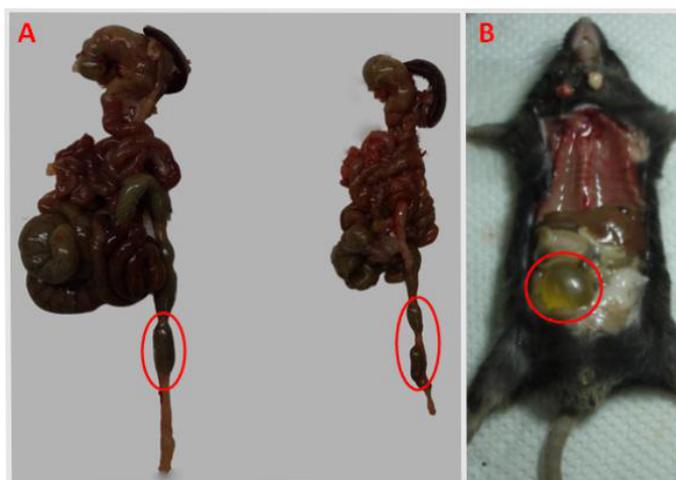


Figura 7: A: Trato gastrointestinal de rato (esquerda) e camundongo (direita) mostrando às fezes que podem ser coletadas para análise (círculos vermelhos); B: Bexiga de camundongo cheia de urina.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO EM ROEDORES

Diversos parâmetros devem ser considerados para a escolha da via de administração, a saber, o início desejado da ação, as propriedades químicas, pH, esterilidade, toxicidade, viscosidade da substância etc. O início desejado da ação varia de forma decrescente entre os seguintes tipos de rota: intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, intradérmica e oral. As propriedades da substância e o metabolismo delas no organismo devem ser levados em conta antes da escolha da melhor via de administração, visto que algumas rotas interferem na substância e vice-versa.

A substância administrada deve ser diluída em veículo apropriado em um volume máximo adequado para a via de administração escolhida. Nesse sentido, o volume do fluido administrado deve ser levado em consideração para cada via de administração. Na tabela 1 lista-se o volume ideal para cada via de administração.

Via	Volume (mL.kg ⁻¹)
Intravenosa (i.v.)	Até 5 (bolus) e 2 por hora (infusão contínua)
Intraperitoneal (i.p.)	Máximo de 10
Intramuscular (i.m.)	Máximo de 0,05 por local
Subcutânea (s.c.)	Máximo de 5 por local
Intradérmica (i.d.)	0,05-0,1 por local
Oral (VO)	5

Tabela 1 – Volumes recomendados para administração de substâncias por diferentes vias em roedores

Fonte: Turner *et al.* (2011) e Morton *et al.* (2001).

Via intravenosa (i.v.)

O animal deve ser colocado em contensor. Após imersão da cauda em um recipiente contendo água morna (38-39°C) para melhor visualização da veia e assepsia do local, insere-se a agulha de pequeno calibre (26-28G para camundongo e 25-27G para rato) paralela à veia da cauda (geralmente da parte média para a região distal), penetrando suavemente de 2 a 4 mm para o lúmen, mantendo o bisel da agulha com a face para cima (Figura 8), pode-se utilizar cateter do tipo borboleta. Deve-se aspirar levemente para confirmar que o local é o vaso, mas com cuidado para não causar colapso da veia. Na sequência, injeta-se lentamente a solução. Ao final, retira-se a agulha e aplica-se pressão com uma gaze no local para garantir a hemostasia. A vantagem dessa via sobre as outras é que podem ser administradas soluções com pH alto ou baixo.

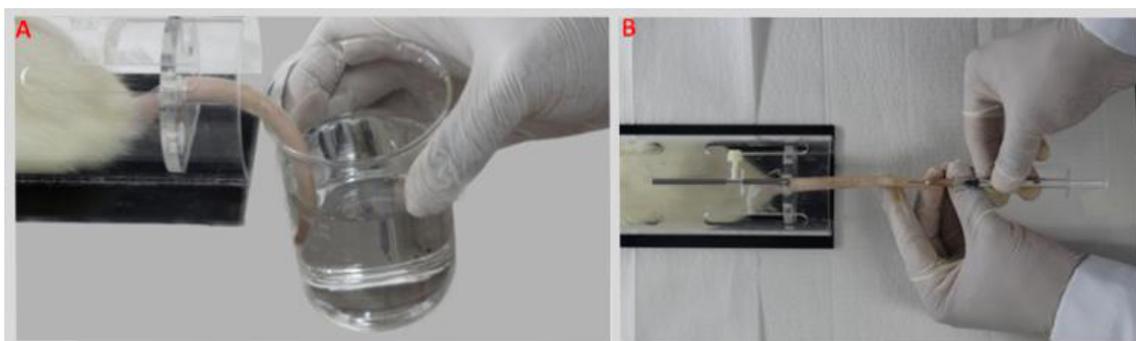


Figura 8: A: Imersão da cauda em um recipiente contendo água morna (38-39 °C); B: Inserção da agulha paralela à veia caudal para aplicação intravenosa em rato.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Via intraperitoneal (i.p.)

A administração por esta via é realizada no terço inferior do abdômen (geralmente quadrante 3 ou 4, Figura 9), em um ângulo de 45°, aproximadamente. É necessário a contenção manual do roedor de maneira levemente inclinado e com a cabeça para baixo para evitar o risco de puncionar órgãos abdominais. Caso seja um roedor com tamanho maior que a mão do manipulador comporte, pode-se conter o animal sobre uma superfície de tal forma que ele se mova o mínimo possível (Figura 9D). Deve-se utilizar uma agulha de calibre pequeno (25-27G para camundongo e 23-25G para rato). Após a inserção da agulha no local e antes de administrar, deve-se aspirar para assegurar-se que nenhum órgão foi perfurado. Não havendo fluido na seringa, após aspirar, injeta-se suavemente a substância.

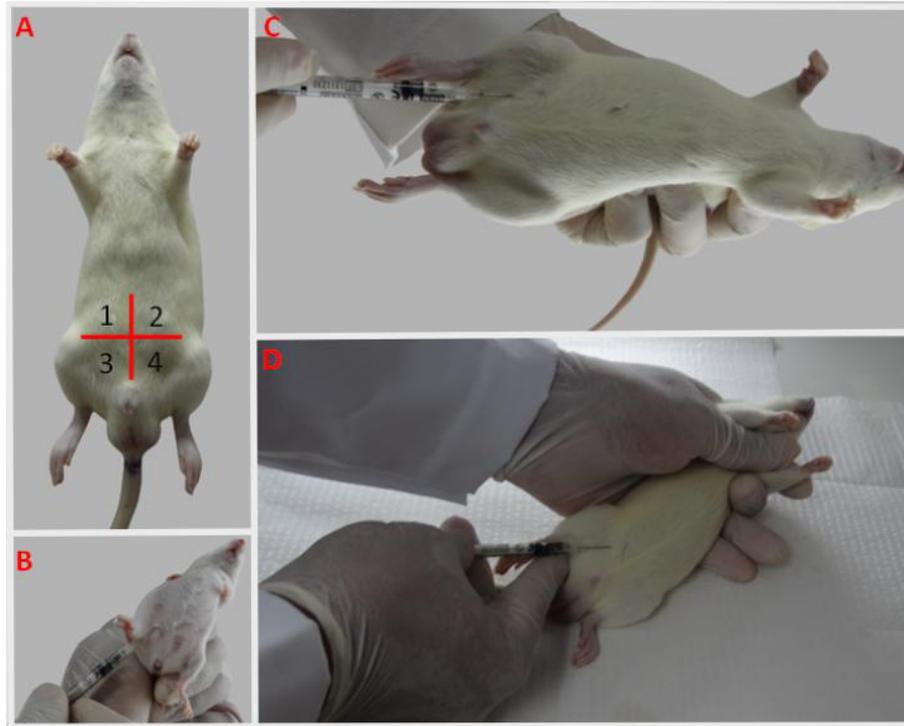


Figura 9: A: Quadrante de aplicação intraperitoneal; B: Aplicação intraperitoneal no terceiro quadrante de camundongo; C e D: Aplicação intraperitoneal no terceiro quadrante de rato em diferentes posições.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Via intramuscular (i.m.)

Esta via de administração é geralmente dolorosa e deve ser evitada sempre que possível. Em função disso, deve-se administrar um pequeno volume e, se necessário, aplicar em diferentes locais em administrações sucessivas. Um dos locais mais utilizados é na região atrás da coxa (Figura 10). Substâncias irritantes não devem ser administradas por esta via. O animal deve ser contido e após a introdução da agulha (27G para camundongo e 25G para rato), deve-se aspirar brevemente a seringa antes de injetar a substância, para certificar-se de que não penetrou um vaso, neste caso, sangue não deve ser visualizado na seringa. Após esta confirmação, injeta-se a substância lentamente. Na escolha da parte atrás da coxa, deve-se evitar lesionar o nervo ciático, que se estende ao longo do fêmur.



Figura 10: Administração intramuscular em rato na parte atrás da coxa.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Subcutânea (s.c.)

É uma via de administração preferida, a menos que a substância seja irritante localmente. Raramente induz dor e é realizada com animais conscientes, porém em boa contenção manual e de tal forma que o polegar e o indicador formem uma “onda” de pele em cima da cabeça/nuca. Para tanto, deve-se puxar uma quantidade generosa da pele solta sobre a nuca. O local de inserção da agulha (27G para camundongo e 25G para rato) para aplicação é na pele solta sobre o interescapular (na base da “onda” de pele formada), logo acima da cabeça (Figura 11).



Figura 11: Administração subcutânea em A: rato B: camundongo.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

Intradermica (i.d.)

Esta via de administração requer anestesia e tricotomia do local. Geralmente não é recomendada, a não ser que seja um protocolo específico. Após a assepsia, a pele do animal deve ser esticada e a agulha (27G para camundongo e rato) inserida logo abaixo da camada superficial da epiderme, com a agulha quase paralela à pele. A substância deve ser injetada lentamente sem aspirar. A aplicação é constatada pela formação de uma bolha na pele do animal (Figura 12).



Figura 12: Administração intradérmica.

Fonte: Disponível em: http://www.theodora.com/rodent_laboratory/injections.html.

Oral (VO)

Esta via é frequentemente usada em administrações repetidas e a longo prazo. Entretanto, requer uma estabilidade da substância às secreções gástricas e não ser irritante ou corrosivo para a mucosa. Pode ser realizada por gavagem, com agulha apropriada e de tamanho específico para rato ou camundongo (agulha de alimentação com ponta de esfera), conforme mostra a figura 13, ou pode-se misturar a substância na dieta ou dissolvê-la na água de beber, caso a estabilidade da substância não seja alterada na mistura.

Para o procedimento de gavagem, o animal deve ser firmemente contido na mão do manipulador com o pescoço levemente estendido. A ponta da agulha deve ser deslizada suavemente pela língua do animal sem forçar, se for colocada corretamente a agulha deslizará com facilidade pelo esôfago e o material poderá ser administrado. A agulha não deve ser rotacionada depois de introduzida no animal, visto que a ponta da agulha pode romper o esôfago. A vantagem da via por gavagem é a administração da dose exata, com intervalos de tempo bem controlados. Entretanto, pode causar estresse diário, bem como a administração incorreta pode levar a perda do animal, caso a substância seja administrada no trato respiratório em vez do trato gastrointestinal ou o esôfago for perfurado. A mistura da substância a ser administrada na comida ou água de beber requer uma medida prévia de consumo alimentar sólido ou líquido por animal para ajuste de dose, a qual não será exata.

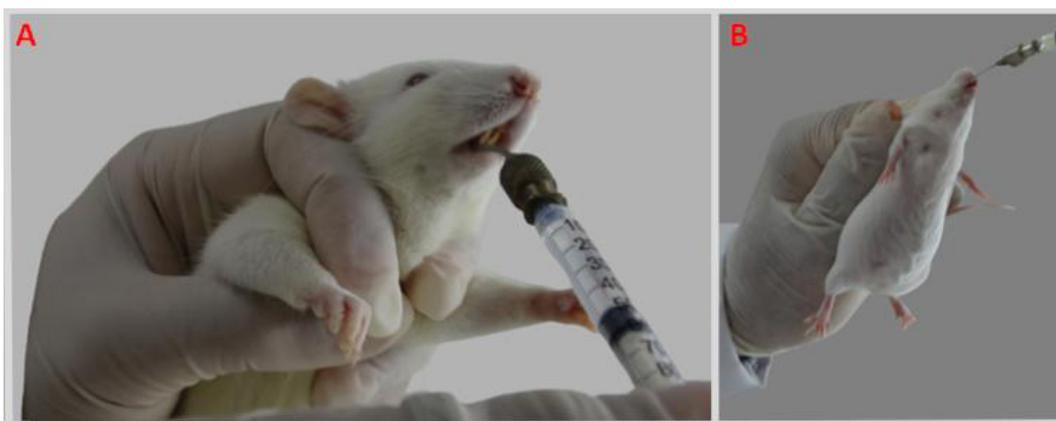


Figura 13: – Administração oral por gavagem em A: rato e em B: camundongo.

Fonte: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obtenção de uma amostra biológica de qualidade requer muitos cuidados, desde a experimentação *in vivo* até o manuseio durante os ensaios. Desta forma, é importante sempre discutir com os envolvidos na pesquisa e com o veterinário da instituição, a via de administração, bem como a técnica mais adequada para a coleta das amostras biológicas, de tal forma que se adequem aos principais objetivos do estudo. Outro ponto que deve ser destacado é o cuidado ético com os animais em experimentação: evitar causar dor, estresse e infecção ao animal, respeitando sua fisiologia no momento da coleta de sangue e administração de substâncias, garantindo todos os cuidados pré e pós-manuseio, somado ao aproveitamento máximo do animal, o que configura, desta forma, a incorporação do princípio dos 3Rs no estudo.

REFERÊNCIAS

BEETON, C.; GARCIA, A.; CHANDY, K. G. Drawing Blood from Rats through the Saphenous Vein and by Cardiac Puncture. **JoVE**. 7. 2007. Disponível em: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=266>, DOI: 10.3791/266.

BIOMETHODOLOGY for laboratory mice. Disponível em: http://www.theodora.com/rodent_laboratory/injections.html http://www.theodora.com/rodent_laboratory/blood_collection.html

BROWN, C. Blood collection from the tail of a rat. **Clinical Techniques**. v.35, n.8, 2006.

DIEHL, K.H. *et al.* A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. **Journal of Applied Toxicology**. v. 21, p.15-23, 2001.

The Animal Experiments Inspectorate. Guidelines for taking blood samples from mice and rats. Ministry of environment and food of Denmark. Danish veterinary and food administration. Disponível em: <https://www.foedevarestyrelsen.dk/SiteCollectionDocuments/Dyrevelfaerd%20og%20veterinaermedicin/Dyrevelf%C3%A6rd/Fors%C3%B8gsdyr/Dyrefors%C3%B8gstilsynet/Guidelines%20-%20engelsk/Guidelines%20for%20taking%20blood%20samples%20from%20mice%20and%20rats.pdf>. Acesso em: 06/04/2022; 17:35h.

HOFF, J. Methods of Blood Collection in the Mouse. **Lab Animal**. v. 29, n. 10, 2000.

KUMAR, M., DANDAPAT, S., SINHA, M.P., KUMAR, A., RAIPAT, B. S. Different blood collection methods from rats: A review. **Balneo Research Journal**. v. 8, n. 1, 2017.

MORTON, D.B. *et al.* Joint Working Group on Refinement. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. **Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals**, v. 35, p. 1-41, 2001.

NEVES, S.M.P. *et al.* **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. 2013.

PARASURAMAN, S.; RAVEENDRAN, R.; KESAVAN, R. Blood sample collection in small laboratory animals. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 1, n. 2, p. 87-93, 2010.

SHIMIZU, Shinya. Routes of Administration. In: Hedrich, Hans; Bullock, Gillian. **The Laboratory Mouse: The Handbook of Experimental Animals**. Copyright 2004 Elsevier. 632p. Chapter 32. p. 527-541. Disponível em: <file:///C:/Users/valer/Dropbox/RECIFE/UFPE/Escritas/Livro%20bio%C3%A9tica%20UFPE/Administra%C3%A7%C3%A3o/Shimizu,%202004-Cap%2032%20-%20Routeadministration%20-%20ISBN%200-1233-6425-6.pdf>. Acesso em: 06/04/2022; 18:56h.

TURNER, P.V. *et al.* Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v. 50, n.5. 2011.

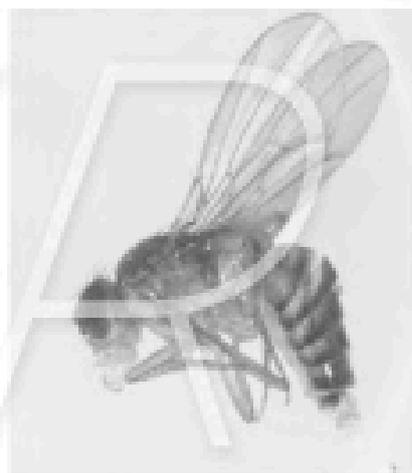
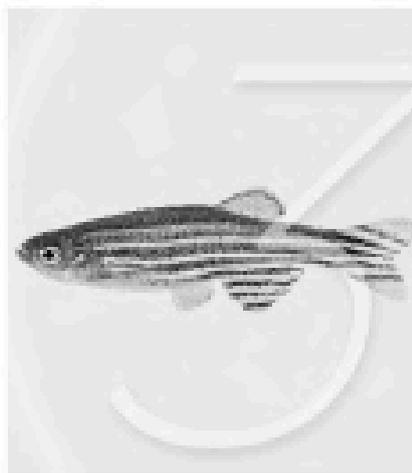
BIOÉTICA E MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 



BIOÉTICA E MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 

