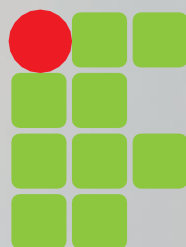


Princípios Básicos de Pesquisa com Animais de Laboratório

Tharcia Kiara Beserra de Oliveira
Jaime José da Silveira Barros Neto
Isabela Barros Almeida



**INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA**
SERGIPE



Doutor em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Campina Grande, Mestre em Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande, Especialista em Ecoturismo: Interpretação e planejamento de atividades em áreas naturais, Universidade Federal de Lavras, Bacharel em Turismo com Habilitação em Planejamento e Organização do Turismo, Universidade Federal da Paraíba. Professor do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico de Turismo, Hospitalidade e Lazer no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe. Linhas atual de pesquisa: ciência e tecnologia de alimentos, agroecologia, turismo rural, ecoturismo



Enfermeira. Mestrado em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Especialista em Enfermagem do Trabalho pela Faculdade Integrada de Patos (FIP). Graduado em Enfermagem pela Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM)



Médica Veterinária. Mestrado pela Universidade Federal de Campina Grande, no departamento de pós-graduação em Engenharia Agrícola. Especialista em Auditoria e Saúde. Membro da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento - CESED e responsável pelo Biotério da Faculdade de Ciências Médicas FCM -Campina Grande.



Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Sergipe
Reitoria: Avenida Jorge Amado, 1551 - Loteamento Garcia Bairro Jardins - Aracaju / Sergipe
CEP.: 49025-330 - CNPJ: 10.728.444/0001-00
TEL: 55 (79) 3711-3222

Isabela Barros Almeida
Jaime José da Silveira Barros Neto
Tharcia Kiara Beserra de Oliveira

PRINCÍPIOS BÁSICOS DE PESQUISA COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

1º edição



PRINCÍPIOS BÁSICOS DE PESQUISA COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Isabela Barros Almeida
Jaime José da Silveira Barros Neto
Tharcia Kiara Beserra de Oliveira

Editor chefe: Igor Adriano de Oliveira Reis

Conselho editorial: EDIFS

Projeto gráfico e diagramação: Thiago Guimarães Estácio, Jonathas Farias de Carvalho

Nenhuma parte desta obra pode ser reproduzida ou duplicada sem autorização expressa da autora e do editor.

©2016 by Thárcia Kiara Beserra de Oliveira, Isabella Barros Almeida, Jaime José da Silveira Barros Neto.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P957 **PRÍNCIPIOS básicos de pesquisa de animais de laboratório / organização [de] Isabela Barros Almeida, Jaime José da Silveira Barros Neto; Tharcia Kiara Beserra de Oliveira - 1.ed. - Aracaju: Edifs, 2016.**
54 p.: il.

ISBN:

1. Ética em pesquisa. 2. Animais de laboratório. 3. Manuseio de animais. I. Título. II. Oliveira, Thárcia Kiara Beserra de. III. Almeida, Isabella Barros. IV. Barros Neto, Jaime José da Silveira

CDU 57 084

Ficha catalográfica elaborada pela Direção Geral de Bibliotecas do IFS

Editora do IFS

Avenida Jorge Amado, 1551 - Loteamento Garcia Bairro Jardins - Aracaju / Sergipe.

CEP.: 49025-330 TEL: 55 (79) 3711-3222

E-mail: edifs@ifs.edu.br

Publicado no Brasil – 2016



Ministério da Educação

**Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia de Sergipe**

Presidente da República
Dilma Roussef

Ministro da Educação
Aloizio Mercadante

Secretário da Educação Profissional e Tecnológica
Marcelo Machado Feres

Reitor IFS
Ailton Ribeiro de Oliveira

Pró-reitora de Pesquisa e Extensão
Ruth Sales Gama de Andrade

Agradecimento

Agradecemos ao Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Sergipe (IFS) pelo empenho e dedicação à pesquisa, contribuição para o desenvolvimento da ciência e pela oportunidade de publicação deste livro.

Apresentação

Esta obra transcorre sobre os princípios básicos de pesquisa com animais de laboratório de forma ética, a fim de proporcionar ao leitor (acadêmicos, professores e pesquisadores) um guia de como proceder em pesquisas laboratoriais com animais, visto que o avanço nos estudos biológico, muitas vezes, requer a utilização dos mesmos, porém tais procedimentos devem ser rigorosamente analisados para que se tenha relevância à saúde humana ou animal de forma clara e ética.

Aspectos históricos, filosóficos, medicinais e legais são assuntos retratados neste livro, a fim de fazer com que haja uma reflexão do leitor sobre as pesquisas que são realizadas e que vêm avançando na ética, na moral e ao respeito ao animal em seu perfeito bem-estar.

Termos como morte humanitária e eutanásia são extremamente polêmicos, devem ser usados de forma correta e apoiados pelos pesquisadores seguindo princípios e leis que estão debruçados nesse trabalho. Estrutura física e fatores ambientais devem ser respeitados para utilização de animais em um biotério.

Em seus oito capítulos, os autores apresentam informações inicialmente básicas para a aplicação de conhecimentos no campo prático, tornando mais fácil o manuseio com animais. Esperamos que a simplicidade com que foram apresentados os oito capítulos do livro permita melhorar a contribuição do mesmo para seus leitores.

Thárcia Kiara Beserra de Oliveira

SUMÁRIO

CAPITULO 1 - RATO.....	10
1.1 INTRODUÇÃO.....	10
1.2 COMPORTAMENTO.....	11
121 Comportamento sexual.....	11
122 Comportamento puerperal.....	12
1.3 CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS.....	13
1.4 REPRODUÇÃO.....	14
1.5 CLASSIFICAÇÃO GENÉTICA.....	15
1.6 CONTENÇÃO E MANIPULAÇÃO.....	15
1.7 NECESSIDADES ESPECIAIS.....	16
1.8 DOENÇAS COMUNS.....	16
1.9 REFERÊNCIAS.....	18
CAPITULO 2 - CAMUNDONGO.....	19
2.1 INTRODUÇÃO.....	19
2.2 COMPORTAMENTO.....	20
2.3 CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS.....	20
2.4 REPRODUÇÃO.....	21
2.5 PADRÃO GENÉTICO.....	22
2.6 ALOJAMENTO.....	22
2.7 CONTENÇÃO E MANIPULAÇÃO.....	23
2.8 DOENÇAS COMUNS.....	23
2.9 REFERÊNCIAS.....	24
CAPITULO 3 - PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE RATOS E	
CAMUNDONGOS.....	26
3.1 INTRODUÇÃO.....	26
3.2 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	27
3.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	28
3.4 REFERÊNCIAS.....	30
CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DA DOR, ANALGESIA E ANESTESIA EM RATOS E	
CAMUNDONGOS.....	31
4.1 INTRODUÇÃO.....	31
4.2 AVALIAÇÃO DA DOR.....	32
4.3 ANALGESIA.....	33
4.4 ANESTESIA.....	33
4.5 REFERÊNCIAS.....	36
CAPÍTULO 5 - ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS E COLETA DE FLUIDOS EM	
RATOS E CAMUNDONGOS.....	37
5.1 INTRODUÇÃO.....	37
5.2 VIAS E LOCAIS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS.....	38
5.2.1 Administração por via oral (VO).....	38

5.2.2 Administração por via subcutânea (SC).	39
5.2.3 Administração por via intramuscular (IM).	40
5.2.4 Administração por via endovenosa (EV).	41
5.2.5 Administração por via intraperitoneal (IP).	41
5.3 COLETA DE FLUIDOS.	43
5.3.1 Coleta em ratos.	43
5.3.2 Coleta em camundongos.	44
5.4 REFERÊNCIAS.	45
CAPÍTULO 6 - ESTRESSE EM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.	47
6.1. INTRODUÇÃO.	47
6.2 BEM-ESTAR ANIMAL E ESTRESSE	48
6.3 ESTRESSE E PESQUISA CIENTÍFICA.	49
6.4 RESPOSTA FISIOLÓGICA AO ESTRESSE.	49
6.5 CLASSIFICAÇÃO DO ESTRESSE	51
6.6 CAUSAS E MEDIDAS PREVENTIVAS AO ESTRESSE	51
6.6.1 Temperatura.	51
6.6.2 Umidade.	51
6.6.3 Iluminação.	52
6.6.4 Sons.	52
6.6.5 Superpopulação.	52
6.6.6 Transporte	52
6.6.7 Gaiolas.	53
6.6.8 Treinamento animal e humano.	53

REFERÊNCIAS

Apresentação

As pesquisas com animais, as abordagens terapêuticas e as práticas curativas, ainda que de maneira incipiente e empírica, fazem parte da humanidade desde as eras prímevas da História. A pré-história compreende o período cronológico que antecede a invenção da escrita; há contradições ao referir-se como pré-história, uma vez que História é construída pelas relações sociais, culturais e econômicas e sendo a escrita, portanto, apenas o registro de tais relações.

A Medicina em seu insidioso início teve grande influência de crenças religiosas e era uma "arte" praticada prioritariamente por sacerdotes. As doenças e os fenômenos naturais em geral eram associados a eventos sobrenaturais e à magia. Acreditava-se que as doenças e as catástrofes provinham de deuses ou entidades divinas que, de alguma forma, vingavam-se das pessoas pelos seus atos errôneos na terra. Inúmeros cultos religiosos e rituais eram oferecidos a tais divindades em uma tentativa de prevenção e/ou cura tanto das enfermidades quanto dos fenômenos naturais que assolavam as comunidades mais antigas.

A Filosofia surge a partir do momento em que as explicações sobrenaturais tornaram-se insuficientes para esclarecer as perguntas da sociedade. A aquisição de conhecimento ao longodas gerações permitiu ao homem o desenvolvimento intelectual e cultural suficiente para questionar tudo aquilo que ocorria ao seu redor sem que as crenças religiosas fossem

consideradas como o único meio de elucidar os acontecimentos tratados como desconhecidos.

Origina-se, então, o pensamento crítico. A percepção de um fato desconhecido leva os primeiros pensadores ao desenvolvimento de uma curiosidade ingênua sobre os acontecimentos. Baseando-se no aprendizado adquirido e passado através das gerações, um questionamento é feito e inúmeras hipóteses são lançadas a estudo para que haja separação entre a verdade teológica (de caráter atemporal e baseada nas crenças, na fé) e a verdade científica (dada em espaço de tempo curto, baseada na experimentação em que os experimentos repetidos devem produzir os mesmos resultados). A ciência é, portanto, o conjunto de atividades desenvolvidas por seres racionais e lógicos com o objetivo de separar o que é aparente do que é real, tendo como finalidade primordial o bem-estar da sociedade.

CAPITULO 1 - RATO

*Antônio Carlos E. de A. Bonfim
Alexandre Dantas de Medeiros Filho
Daniel Pinheiro Callou do Nascimento
Maria Flávia Karina Costa
Chirlaine Cristine Gonçalves*

1.1 INTRODUÇÃO

O rato de laboratório é um roedor da família Muridae, pertence à espécie *Rattus norvegicus*, também conhecido como rato Norway são usados na maioria dos biotérios. Essa espécie originou-se no norte da China e disseminou-se para outras partes do mundo a partir da Europa Ocidental, acredita-se que foram os primeiros animais a serem utilizados em experimento de laboratório. Apresenta grande capacidade de adaptação e pode sobreviver em uma ampla variedade de climas. A variedade doméstica dessa espécie tem sido usada para fins experimentais devido à facilidade de manejo, de alojamento, reprodução e possibilidade de criação de vários tipos de modelos experimentais. O rato albino foi padronizado pelo Instituto Wistar, importante centro de pesquisa dos Estados Unidos que fornecia esses animais para outros laboratórios (LAPCHIK, *et al.*, 2010 & SIROIS, 2007).

Taxonomia:

- Classe: Mammalia
- Ordem: Rodentia
- Família: Muridae
- Gênero: Rattus
- Espécies: *Rattus norvegicus* (rato doméstico ou rato marrom) *Rattus rattus* (rato

preto).

1.2 COMPORTAMENTO

Os ratos interagem bem com humanos e são animais de comportamento dócil quando manipulados de maneira adequada e regular, sempre que possível o mesmo manipulador deve manusear os animais diariamente, assim, os animais tendem a se familiarizar com o técnico. Esses roedores são sociáveis e convivem bem quando alojados em pequenos grupos. No entanto, os machos podem apresentar certa agressividade com companheiros de gaiola no período correspondente à sua maturação sexual, enquanto as fêmeas podem tornar-se ariscas para proteger seus filhotes. Os ratos são animais de hábitos noturnos, período no qual se alimentam e apresentam maior atividade, tendem a passar o dia dormindo e não são capazes de enxergar em cores. Adaptam-se bem em diversas condições e preferem ambientes que lhes permita explorar e escalar. A mastigação constante é importante para evitar o crescimento dos seus incisivos, que é contínuo (LAPCHIK, *et al.*, 2010 & SIROIS, 2007).

1.2.1 Comportamento sexual

O comportamento sexual do macho é determinado, principalmente, pela testosterona, sem a qual não há qualquer instinto de acasalamento na presença de fêmeas, como visto em ratos castrados. Na presença de outros machos, o volume de sêmen ejaculado é maior que o normal na ausência de rivais, o que é uma forma de competição pela fecundação da fêmea (LAPCHIK, *et al.*, 2010)

A fêmea apresenta comportamentos sexuais de receptividade, atratividade e proceptividade, induzidos principalmente por estrógeno e progesterona. Tais comportamentos são demonstrados principalmente pela forma como a fêmea aborda o macho, tocando-o com o focinho, e pela postura de lordose característica de receptividade sexual (LAPCHIK, *et al.*, 2010 & SIROIS, 2007).

1.2.2 Comportamento puerperal

As fêmeas se preparam para o momento do parto com a construção de um ninho com materiais que consigam recolher e possam manter os filhotes em temperatura adequada. Após o parto, as ratas comem a placenta, limpam os filhotes e os acolhem para lactação. Um dos cuidados essenciais da mãe é o estímulo da região anogenital, através de lambidas, para gerar nos filhotes os reflexos de micção e defecação. O rato nasce com o peso entre 4 g a 6 g, desprovido de pelos e corpo avermelhado, com exceção das vibrissas (responsáveis pelo tato), olhos fechados, o pavilhão auricular também fechado (BAKER; LINDSEY; WEISBROTH, 1979; DIXON, 2004; LAPCHIK *et al.*, 2010).



Figura 1.1. Ninha de ratos Wistar no 1º dia de vida
Fonte: Núcleo de Investigação Experimental – FCM - Campina Grande



Figura 1. 2. Corpo avermelhado e olhos completamente fechados ao nascer
Fonte: Núcleo de Investigação Experimental – FCM - Campina Grande

Durante o período puerperal, fatores desencadeantes de estresse materno e manipulação da ninhada podem fazer com que a mãe abandone a ninhada ou devore sua cria, ao constatar o nascimento dos animais aconselha-se a não manipular a ninhada até o terceiro dia de vida. O canibalismo também é comum na presença de filhotes mortos como uma forma de obter proteínas e manter o ninho limpo. Há estudos que mostram que os cuidados maternos são importantes para um bom desenvolvimento da prole, pois o lambar da mãe estimula a liberação de serotonina no cérebro dos filhotes, ativando alterações epigenéticas sobre certos fatores de transcrição (BAKER, LINDSEY WEISBROTH, 1979; DIXON, 2004; LAPCHIK *et al.*, 2010; SIROIS, 2007).

1.3 CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS

Os ratos, assim como outros roedores, são animais de dentição única (monofiodontes), não possuem caninos e seus incisivos crescem durante toda a vida, necessitando de desgaste para controlar o seu tamanho. Possuem uma longa cauda coberta de escamas que geralmente é maior no macho, podendo chegar a 85% do comprimento do corpo, e que atua no equilíbrio e na perda de calor. Esses roedores não possuem glândulas sudoríparas e a dissipação do calor é feita principalmente através da salivação e da dilatação de vasos da cauda (LAPCHIK, *et al.*, 2010 & SIROIS, 2007).

Algumas estruturas glandulares peculiares são encontradas nesses animais, como as glândulas sebáceas localizadas na base das orelhas e a glândula nasal lateral, responsável pela umidificação do ar e da mucosa. Atrás dos olhos estão as glândulas lacrimais que secretam porfirina, substância que pode causar pigmentação avermelhada nas proximidades dos olhos ou narinas, principalmente quando os ratos estão doentes ou sob estresse, e que pode ser confundida com sangue. O aumento das secreções em tais condições é denominado cromodacriorréia. Os membros anteriores possuem quatro dedos cada um, enquanto os membros posteriores possuem cinco. Todo o corpo é coberto por pelo, com exceção da cauda, nariz, palmas, solas e lábios.

Os ratos não têm vesícula biliar e a bile entra diretamente no duodeno. O esôfago apresenta uma porção longa que se estende caudalmente ao diafragma. O pâncreas é visto como um órgão difuso e o fígado é dividido em quatro lobos. Os pulmões apresentam divisão desigual, sendo o lobo esquerdo menor e o direito dividido em quatro seções. No tórax há grande quantidade de gordura marrom, constituindo importante reserva energética e referida como tecido de hibernação. As fêmeas possuem seis pares de glândulas mamárias e útero bicornuado (BAKER; LINDSEY; WEISBROTH, 1979; DIXON, 2004; LAPCHIK, *et al.*, 2010; MARQUES, 2005).

1.4 REPRODUÇÃO

O sexo pode ser determinado ao nascimento pelo tamanho e pela posição da papila genital: as fêmeas têm papila genital menor e mais próxima ao ânus. Os machos atingem a puberdade entre 40 e 75 dias e a descida dos testículos geralmente ocorre entre 30 e 60 dias, tornando a bolsa escrotal proeminente. As glândulas sexuais acessórias dos machos são bastante desenvolvidas e as secreções da vesícula seminal, da próstata e da glândula de coagulação são responsáveis pela formação do tampão mucoso que é depositado na vagina da fêmea após a cópula. As fêmeas entram na puberdade entre 37 e 67 dias e apresentam seu ciclo estral completo em cerca de cinco dias e dividido nas seguintes fases:

- Proestro: caracterizado pelo amadurecimento folicular;
- Estro: período em que a fêmea está receptiva para cópula;
- Metaestro: fase de formação dos corpos lúteos;
- Diestro: período de pico da progesterona para manter a gestação. Nessa fase não ocorre maturação de novos folículos.

A gestação dura em torno de 21 dias e as ninhadas têm de 6 a 12 filhotes que, ao nascimento, são surdos, cegos e sem pelos. Suas orelhas abrem-se na primeira semana de vida; os olhos, entre 10 e 12 dias. O desmame ocorre por volta de 21 dias (ANDRADE, PINTO, OLIVEIRA, 2009; LAPCHIK *et al*, 2010; SIROIS, 2007).



Figura 1.3. Órgão reprodutor do rato macho.

Fonte: Núcleo de Investigação Experimental – FCM - Campina Grande

O cruzamento pode ser feito com cobertura monogâmica, sendo a fêmea coberta por um único macho, ou poligâmica, onde duas ou mais fêmeas são colocadas para cobertura por um único macho. A separação das fêmeas prenhas reduz as desvantagens como o estresse pelo convívio em grupo, possibilidade de brigas e de lesão à prole. Nessa situação, a fêmea passa a ser disponível para nova cobertura apenas após o desmame, que pode ser feito aos 21 dias separando os filhotes em gaiolas com grupos do mesmo sexo. Esse consiste em um sistema temporário de acasalamento, conhecido como harém, bastante adotado pela simplicidade e facilidade de execução. O acasalamento geralmente ocorre à noite e a confirmação da cópula é feita pela

verificação da presença de tampão mucoso, sangramento vaginal ou presença de espermatozóides na visualização microscópica de esfregaço vaginal (ANDRADE, PINTO, OLIVEIRA, 2009)

1.5 CLASSIFICAÇÃO GENÉTICA

Os ratos podem ser classificados em isogênicos ou heterogênicos. Linhagens isogênicas são aquelas em que foi mantido o cruzamento entre irmãos por, no mínimo, 20 gerações consecutivas, o que aumenta as chances de homozigose para um locus gênico, tornando o padrão genético mais homogêneo. Linhagens heterogênicas são aquelas em que não houve controle do padrão genético, marcada por cruzamentos aleatórios e alta taxa de heterozigose.

Tabela 1.1. Exemplos de linhagens e seu uso em pesquisa

Linhagem	Característica	Utilidade Experimental
Long Evans – heterogênica	Branco com capuz preto; apresenta resistência a problemas respiratórios	Obesidade, estudos neurológicos, cognitivo-comportamentais e toxicológicos
Wistar – heterogênica	Albino; bastante dócil.	Oncologia, nutrição, envelhecimento
Lewis – isogênica	Albino; propensos a doenças autoimunes	Doenças autoimunes e transplantes
Spontaneously Hypertensive Rat – isogênica	Albino; tendência a hipertensão	Hipertensão e drogas anti-hipertensivas

1.6 CONTENÇÃO E MANIPULAÇÃO

A forma de contenção varia de acordo com a finalidade do procedimento a ser realizado. Para remoção do animal da gaiola, deve-se segurar pela cauda, no terço mais proximal ao corpo, evitando assim que ele possa virar-se contra o manipulador para morder. Uma forma bastante útil para administração de substâncias por gavagem, para administração de injeção intraperitoneal ou outros procedimentos é a contenção com a cabeça do animal entre os dedos indicador e médio da mão dominante do tratador, com o polegar e os demais dedos apoiados a região abdominal do rato, afastando os membros inferiores. Para facilitar a manipulação, pode-se utilizar compressa cirúrgica dobrada, reduzindo as chances de mordida e protegendo também o animal.

A contenção para coleta de sangue da cauda ou verificação de temperatura retal pode ser feita com caixas plásticas de contenção em formato tubular, com perfurações que permitam que o animal respire normalmente. O mesmo dispositivo pode ser improvisado com garrafa plástica pequena (300 ml) com o fundo cortado. O animal pode, então, ser estabilizado pela cauda, ficando

imóvel para a realização do procedimento (LAPCHIK *et al*, 2010; SIROIS, 2007).

1.7 NECESSIDADES ESPECIAIS

É de fundamental importância o adequado alojamento dos animais, que em geral, é feito em gaiolas tipo *caixa de sapato*, com fundo sólido ou fundo suspenso. Em gaiolas de fundo sólido, os animais ficam constantemente em contato com a cama, que deve ser de material atóxico, livre de poeira ou compostos que possam causar problemas respiratórios, seco e absorvente. O ambiente pode ser enriquecido com ninhos, tubos, grades de escalada e outros objetos que permitam ao animal melhor adaptação e conforto. Os ruídos devem ser reduzidos, pois barulho em excesso pode colocar o rato sob estresse e causar convulsões. Água potável fresca deve estar sempre disponível, assim como ração adequada para roedores. A maioria come *ad libidum*, em média, 5g de ração para cada 100g de peso ao longo do dia (BAUMANS, 2006; MAJEROWICZ, 2009).



Figura 1.4. Alojamento tipo caixa de sapato com fundo sólido.
Fonte: Núcleo de Investigação Experimental – FCM - Campina Grande

1.8 DOENÇAS COMUNS

Os ratos estão suscetíveis a doenças não infecciosas causadas por alterações genéticas, condições inadequadas de alojamento, estresse, desnutrição e senilidade. É comum que animais sob determinadas condições de estresse arranquem os próprios pelos (barbeamento), que algumas vezes pode resultar em grandes áreas desnudas, simétricas ou não. Esse barbeamento pode, algumas vezes, ser feito por companheiros de gaiola. Umidade ambiental inferior a 20% pode resultar na constrição em anel da cauda em ratos jovens, algumas vezes associada a necrose. Certos tipos de neoplasias podem ser bastante comuns em algumas linhagens de ratos, principalmente em animais mais velhos, respondendo a uma grande fração das doenças de caráter não infeccioso nesses roedores. Outras doenças comuns são a glomerulonefropatia crônica,

poliarterite nodosa e degeneração miocárdica. Traumas de briga com outros ratos podem ser bastante comuns, principalmente entre machos que convivem na mesma gaiola (BAKER, LINDSEY, WEISBROTH, 1979; DIXON, 2004; LAPCHIK *et al*, 2010; MARQUES, 2005).



Figura 1.5. Lacrimejamento avermelhado (porfirina) em rato wistar.
Fonte: Núcleo de Investigação Experimental – FCM - Campina Grande

Doenças infecciosas e parasitárias podem ser causadas por bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintos. Além disso, esses animais podem ser hospedeiros de ectoparasitas, como ácaros e pulgas, que podem ser transmissores de agentes infecciosos, principalmente hemoparasitas, como *Plasmodium berghei* e *vinckei*, *Trypanossoma cruzi* e *Babesia muris* (LAPCHIK *et al*, 2010; SIROIS, 2007).

A sialodacrioadenite é causada por agente viral altamente infeccioso, transmitido através da respiração ou secreções respiratórias. Causa necrose de glândulas salivares e lacrimais, apresentando sinais de edema cervical e nas glândulas acometidas, fotofobia, rinite e cromodacriorréia. Os animais doentes devem ficar isolados por até 8 semanas. Outros vírus comuns em ratos são o vírus Sendai (pneumotrópico e altamente contagioso, causador de epidemias e surtos de mortalidade em colônias), hantavírus, coronavírus, citomegalovírus, adenovírus e rotavírus. A maioria dessas viroses não apresenta manifestações clínicas ou apresentam-se autolimitadas. No entanto, animais sob suspeita de infecções virais devem ser afastados dos demais (LAPCHIK *et al*, 2010; SIROIS, 2007)

Infecções micóticas na pele podem ser bastante comuns nesses animais. São causadas principalmente por *Trichophyton mentagrophytes* e manifestam-se como perda de pelo, gerando áreas de alopecia, formação de lesões crostosas e espessamento da pele com descamação furfurácea. Fungos podem ser transmitidos por contato direto e os animais infectados devem ser isolados durante o tratamento com agentes antimicrobianos.

São comuns em ratos infecções bacterianas, muitas vezes causadas por *Bacillus piliformis*, *Pasteurella pneumotropica*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma pulmonis* etc., acometendo principalmente as vias aéreas e apresentando potencial de contágio variável, mas que podem representar risco para as

colônias e devem ser prontamente identificadas e tratadas apropriadamente com antimicrobianos indicados para cada agente específico (ANDRADE, PINTO, OLIVEIRA, 2002).

1.9 REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.; PINTO, SC.; OLIVEIRA, RS., Orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.

BAKER, H.; LINDSEY J.; WEISBROTH, S. **The Laboratory Rat**. New York: Academic Press, 1979.

BAUMANS, V. The Laboratory mouse. In: Poole T. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. 7 ed. British: Blackwell Science, v.1, p.282-312, 2006.

DIXON, A. K. The social behavior of mice and its sensory control. In: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P. **The handbook of experimental animals: the laboratory mouse**. USA: Elsevier Academic Press; p. 287, 2004.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

MAJEROWICZ, J. **Boas práticas em biotérios – procedimentos operacionais em biotérios. Boas práticas em biotérios e biossegurança**. Rio de Janeiro: Interciência; p.175, 2008.

MARQUES, Rui Garcia. **Técnica operatória e cirurgia experimental**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

SIROIS, Margi. **Medicina de Animais de Laboratório: Princípios e procedimentos**. São Paulo: Editora Roca, 2007.

CAPITULO 2 - CAMUNDONGO

*Antônio Carlos E. de A. Bonfim
Alexandre Dantas de Medeiros Filho
Daniel Pinheiro Callou do Nascimento
Maria Flávia Karina Costa
Jaime José da Silveira Barros Neto*

2.1 INTRODUÇÃO

O camundongo de laboratório é também conhecido como camundongo albino suíço ou camundongo doméstico. Assim como o rato de laboratório, pertence à família Muridae e é bastante popular como animal doméstico. Existem diversas outras espécies de camundongos, pertencentes a diferentes famílias e gêneros, no entanto, o albino suíço é o mais utilizado em pesquisas experimentais, correspondendo a até 67% de todos os animais utilizados em laboratório. Algumas vantagens favorecem a adoção dessa espécie como modelo animal, tais como: baixo custo, facilidade de manuseio e docilidade, alta taxa de reprodução, período

gestacional curto e informações genéticas já conhecidas. Seu principal uso atualmente é em pesquisas genéticas, pois se estima que a homologia entre o DNA codificador humano e o do camundongo chegue a 90%. Também há grande utilidade desse animal na realização de pesquisas em oncologia e virologia, gerontologia, teratologia e doenças de etiologia autoimune (LAPCHIK et al, 2010; SIROIS, M. 2007).

TAXONOMIA

- Classe: Mammalia
- Ordem: Rodentia
- Família: Muridae
- Gênero: Mus
- Espécies: Mus musculusdomesticus

2.2 COMPORTAMENTO

Os camundongos, quando mantidos em grupo, quase sempre desenvolvem certa hierarquia social. Esses roedores são bastante territoriais, o que pode gerar sérias brigas entre os machos quando colocados juntos. Fêmeas raramente brigam entre si, exceto quando sentem necessidade de proteger sua ninhada. Um comportamento comum é a prática do “barbeamento”, quando o macho dominante arranca os pelos dos companheiros de gaiola, principalmente da face, deixando áreas desnudas delimitadas e sem feridas. Geralmente o macho sem esse tipo de alteração no pelo é o dominante da gaiola. As brigas para estabelecimento da hierarquia podem resultar em ferimentos diversos e até mesmo em mortes. Grupos que brigam frequentemente devem ser separados, pois deve haver compatibilidade social entre os camundongos que convivem juntos no mesmo ambiente (LAPCHIK et al., 2010; SIROIS, 2007).

Esses animais geralmente apresentam hábitos predominantemente noturnos, de ciclo claro/escuro de 12/12h e é importante que sejam manipulados precoce e regularmente, para que o manuseio se torne mais fácil. O período de alimentação ocorre principalmente durante o dia e a agressividade é maior na fase de escuro. A demarcação territorial é feita principalmente através da urina, facilitando a interação social. Os odores que os camundongos liberam influenciam também no comportamento sexual e na agressividade. A audição desses roedores é apurada e sons exacerbados podem causar comportamentos de estresse (ANDRADE, PINTO, OLIVEIRA, 2002; LAPCHIK et al. , 2010; SIROIS, 2007)

2.3 CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS

Os camundongos são animais pequenos e de fácil alojamento. O macho adulto pesa, em

média, 40 g, e apresentam área corporal por peso, o que os torna mais expostos a alterações de temperatura e umidade, além de mais suscetíveis à perda de água. O corpo inteiro é coberto de pelos, exceto em áreas como patas, orelhas e cauda. Os membros anteriores possuem quatro dígitos cada e os posteriores, cinco. Os machos geralmente apresentam um odor pronunciadamente forte. Na face são encontradas as vibrissas, que são pelos mais delgados e alongados, com função sensorial (SIROIS, 2007).

Assim como os ratos, os camundongos possuem uma glândula orbital, a glândula de Harder, que libera substâncias lubrificantes para os olhos e também a porfirina, pigmento de coloração vermelho-acastanhada. Em situações de estresse e infecções, a porfirina pode ser liberada em maiores quantidades, tingindo o pelo da face próximo aos olhos e ao nariz. Os hábitos de limpeza desses animais podem levar o pigmento para outras partes do corpo, dando o aspecto de manchas de sangue. À semelhança da dentição dos ratos e de outros roedores, os camundongos possuem incisivos de raízes separadas e de crescimento contínuo (DIXON, 2004; LAPCHIK *et al.*, 2010).

A medula óssea desses animais permanece ativa por toda a vida. No tórax, há um acúmulo de gordura marrom na região cervical e entre as escápulas. Os pulmões são divididos desigualmente – lobo esquerdo pequeno e único e lobo direito dividido em quatro seções. A pressão arterial sistólica varia de 84 a 105 mmHg e os batimentos cardíacos, de 310 a 840 bpm, no entanto, é importante cada laboratório especificar seus valores próprios, pois podem variar de acordo com a linhagem. O sistema genitourinário é semelhante ao dos ratos, sendo possível a diferenciação entre macho e fêmea pela presença da bolsa escrotal no macho e pela distância anogenital, que é menor nas fêmeas (MAJEROWICZ, 2008; MARQUES, 2005).

2.4 REPRODUÇÃO

As fêmeas são poliétricas, com ciclo de 4 a 5 dias e cio de 9 a 20 horas. A ovulação espontânea ocorre entre 8 e 11 horas após o início do cio e a ovulação pós-parto ocorre de 14 a 28 horas após a parição. Caso não haja fecundação no estro pós-parto, a fêmea apenas retornará ao seu ciclo normal alguns dias após o desmame dos filhotes. No caso de ocorrer cobertura da fêmea nesse período, geralmente o nascimento da segunda ninhada coincide com o período de desmame da primeira, devendo estes ser retirados antes do nascimento dos outros filhotes (LAPCHIK *et al.*, 2010; SIROIS, 2007).

A maturidade sexual ocorre por volta de 50 a 60 dias nas fêmeas e aproximadamente em 50 dias nos machos. A duração da gravidez é de 19 a 21 dias, culminando no nascimento de 10 a 12 filhotes. O tamanho da ninhada pode variar entre as diferentes linhagens e de acordo com a idade das fêmeas. A comprovação do coito pode ser feita pela presença de tampão mucoso vaginal, que permanece por algumas horas após a cobertura da fêmea, ou pela detecção de

espermatozoides na microscopia de esfregaço vaginal. A atividade sexual desses animais é fortemente influenciada por feromônios. Fêmeas alojadas juntas podem, na ausência de machos, apresentar diestro prolongado, enquanto os odores de um macho podem acelerar a chegada do estro (LAPCHIK *et al.*, 2010; SIROIS, 2007).

Os pelos dos filhotes começam a nascer ainda nos primeiros dias de vida. O peso do recém-nascido é de 1-1,5g. A papila genital do macho é maior e mais distante do ânus que nas fêmeas. Por volta de 11 dias, surgem os dentes e o animal passa a comer alimentos sólidos com 12 ou 13 dias. No período puerperal pode ocorrer o canibalismo materno, principalmente quando a fêmea encontra-se em condições de estresse. Geralmente o acasalamento é aconselhado a partir dos 60 dias e os sistemas de reprodução mais frequentemente utilizados são similares aos dos ratos. Comumente é adotado sistema poligâmico, com um macho para cobrir várias fêmeas (LAPCHIK *et al.* 2010; SIROIS, 2007).

2.5 PADRÃO GENÉTICO

De acordo com a forma de cruzamento para obtenção das ninhadas, os camundongos podem ser classificados em linhagens ou ninhadas, com cruzamentos internos, externos ou aleatórios. Uma linhagem é composta por animais que são fruto de cruzamentos aleatórios, não consanguíneos. As linhagens de uso comum em laboratório são Swiss, Swiss-Webster, CFI e SKH1. Raça refere-se a animais obtidos a partir de cruzamentos internos, consanguíneos. São bastante utilizados em pesquisas genéticas pela pureza do genoma para determinadas características desejadas (BAKER, LINDSEY, WEISBROTH, 1979; DIXON, 2004).

2.6 ALOJAMENTO

Os camundongos geralmente são alojados em grupos de 4 ou 5 em caixas de fundo sólido tipo "caixa de sapato". É importante que a caixa seja forrada de material macio, não irritativo, seco, absorvível e livre de contaminação, como espigas de milho, celulose ou maravalha de serragem. Também podem ser usadas gaiolas de fundo suspenso com grades de espaços reduzidos para evitar que os animais se machuquem. O ambiente pode ser enriquecido com materiais que permitam a construção de ninhos, tubos ou brinquedos que permitam ao animal explorar o ambiente. A temperatura deve ser mantida entre 18 e 29° C, com umidade relativa de 40 a 60%. Água fresca potável deve sempre estar à disposição, assim como a alimentação adequada com ração comercial, que contém os nutrientes necessários para o bom desenvolvimento do animal. O consumo médio diário de água é de 15ml/100g de peso, enquanto o de alimento é de 12 a 18g/100g de peso. Os camundongos podem também aproveitar suas próprias fezes, sendo a

coprofagia um hábito comum (LAPCHIK *et al.*, 2010; MARQUES, 2005)

2.7 CONTENÇÃO E MANIPULAÇÃO

A manipulação precoce e frequente dos camundongos os habitua com o contato humano e facilita a contenção e o manuseio. A forma de contenção varia de acordo com a finalidade e o procedimento a ser realizado. O manuseio inicial para remover o animal da caixa deve ser através da preensão da cauda, próximo ao corpo do animal, ou com pinças atraumáticas de extremidades emborrachadas, sempre com bastante delicadeza. Outra forma de retirar o animal da gaiola é com a mão em forma de concha, apanhando o camundongo e um punhado de material de cama. Em seguida, podem ser colocados em caixas especiais de contenção ou seguros pela pele da região da nuca enquanto a cauda é mantida presa (LAPCHIK *et al.*, 2010; SIROIS, 2007).

2.8 DOENÇAS COMUNS

Os camundongos são suscetíveis à maioria das doenças que acometem também os ratos. Em caso de doença infecciosa causada por bactérias, o diagnóstico pode ser confirmado através de exames de culturas microbiológicas. Quando a infecção é causada por vírus, geralmente o diagnóstico é clínico e, quando decorrente de ação parasitária, através de exames de fezes, urina e hemograma. Como grande parte das doenças que acometem esses animais podem ser transmissíveis ao restante da colônia e, até mesmo, ter potencial zoonótico, é imprescindível que haja o diagnóstico adequado e o controle da doença o mais cedo possível (BAUMANS, 2006; LAPCHIK *et al.*, 2010; SIROIS, 2007).

Dentre as doenças de origem bacteriana, são comuns as pneumonias, causadas por diversos agentes etiológicos, tais como: *Mycoplasma pulmonis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella pneumotropica*, *Corynebacterium kutscheri* e *Bordetella bronchiseptica*. Alguns sinais clínicos que acompanham essas infecções são anorexia, bater de dentes, conjuntivite com cromodacriorréia (porfirina) e dispnéia. Tais infecções são potencialmente transmissíveis para outros animais da colônia através de secreções das vias aéreas ou aerossóis e, em geral, não são tratadas em animais de pesquisa. Outra doença comum em camundongos de laboratório é a doença de Tyzzer, causada pelo *Clostridium piliforme* em situações de higiene precária e animais alojados em grandes grupos, resultando em quadro clínico de desidratação, anorexia e diarreia. O tratamento pode ser feito através da adição de tetraciclina à água do bebedouro por 4 ou 5 dias. Camundongos são suscetíveis a uma forma de hepatite causada por diversas espécies do gênero *Helicobacter*. O tratamento deve ser dado através de gavagem com amoxicilina, bismuto e metronidazol, durante 2 semanas. Outras bactérias que podem causar infecções nesses roedores

são *P. multocida*, *Citrobacterfreundii*, *Streptobacillusmoniliformis*, *Streptococcus aureus* e espécies de *Leptospira*, com potencial zoonótico (LAPCHIK *et al.*, 2010; SIROIS, 2007).

O vírus Sendai é responsável pela maioria das doenças respiratórias em camundongos, com alto potencial de transmissão para os animais da colônia através de contato direto ou aerossol. Esse vírus deprime as defesas imunológicas dos pulmões desses animais e os torna mais suscetíveis a diversas infecções bacterianas. A ectromelia, também conhecida como varíola do camundongo, é exclusiva desses roedores e responsável por alta taxa de mortalidade em colônias de laboratório. Cursa com quadro clínico de diarreia, edema da face e das extremidades, erupções cutâneas e conjuntivite. Animais com suspeita ou diagnóstico de ectromelia devem ser isolados e o ambiente desinfetado (LAPCHIK *et al.*, 2010; SIROIS, 2007).

Os camundongos também podem adquirir doenças causadas por helmintos, como: *Hymenolepis nana*, *Aspicularis tetráptera*, *Syphaciaobvelata*, *Heterakisspumosa*, *Nippostrongylusmuris* etc., a maioria causando distúrbios gastrointestinais e respiratórios. Doenças micóticas na pele podem ser causadas por *Trichophytonmentagrophytes* e ectoparasitas, como ácaros (*Myobiamusculi*, *Myocoptesmusculus*, *Radfordiaaffinis*, *Psorergates simplex*), pulgas (*Xenopsyllacheopsis*, *Nosopsyllusfasciatus*, *Leptosyllasegnis*) e piolhos (*Polyplaxserrata*) (LAPCHIK *et al.*, 2010; SIROIS, 2007).

Doenças neoplásicas podem ser comuns em certas linhagens de camundongos, tendo influência também do sexo e da idade. Certas doenças se tornam mais comuns com o avançar da idade, principalmente doenças de fundo genético e degenerativas. Como os camundongos são animais bastante territoriais, ferimentos de brigas podem ser achados comuns em certos grupos, podendo ser bastante graves ou fatais. Animais que apresentam esse tipo de ferimento devem ser transferidos de grupo.

2.9 REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.; PINTO, SC.; OLIVEIRA, RS., orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.

BAKER, H.; LINDSEY J.; WEISBROTH, S. **The Laboratory Rat**. New York: Academic Press, 1979.

BAUMANS, V. The Laboratory mouse. In: Poole T. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. 7 ed. British: Blackwell Science, v.1, p.282-312, 2006.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guide to the care and use of experimental animals**. Ottawa: Ontario; v.1-2, 1996.

DIXON, A. K. The social behavior of mice and its sensory control. In: Hedrich H, Bullock G,

Petrusz P. **The handbook of experimental animals: the laboratory mouse.** USA: Elsevier Academic Press; p. 287-99, 2004.

LAPCHIK, V.B. V.; MATTARAIA, V.G. M.; KO, G. M. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório.** São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

MAJEROWICZ, J. **Boas práticas em biotérios – procedimentos operacionais em biotérios. Boas práticas em biotérios e biossegurança.** Rio de Janeiro: Interciência; 2008.

MARQUES, Rui Garcia. **Técnica operatória e cirurgia experimental.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

SIROIS, Margi. **Medicina de Animais de Laboratório: Princípios e procedimentos.** São Paulo: Editora Roca, 2007.

CAPITULO 3 - PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE RATOS E CAMUNDONGOS

*Antônio Carlos E. de A. Bonfim
Daniel Pinheiro Callou do Nascimento
Maria Flávia Karina Costa
Chirlaine Cristine Gonçalves*

3.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento da fisiologia normal dos animais de laboratório é de fundamental importância para a realização de pesquisas bem sucedidas, principalmente quando há necessidade de dados para comparação com variáveis em estudo, permitindo sua utilização confiável como parâmetros clínicos. Além do interesse para pesquisa experimental, dados referentes à fisiologia normal, às necessidades nutricionais e às características reprodutivas são essenciais para o adequado manejo das espécies em biotério.

3.2 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

Tabela 3.1. Valores de referência de parâmetros fisiológicos em ratos e camundongos

Parâmetro	Camundongo	Rato
Temperatura retal (°C)	35,2 – 37,9	36,5 – 38,5
Frequência respiratória média e variações	163 (84 – 230)	70 – 150
Frequência cardíaca e variações	470 (325 – 780)	383 (261 – 600)
Volume urinário (ml/dia)	1 – 3	10-15
Pressão arterial (mmHg): Sistólica /diastólica	113-147/81-106	84-134/60-90
Fotoperíodo indicado (horas)	12 – 14	12 – 14

Adaptado de MARQUES, 2005

Tabela 3.2. Valores de referência de parâmetros nutricionais em ratos e camundongos

Parâmetro	Camundongo	Rato
Início de alimentação sólida (dias)	12 – 15	10 – 12
Desmame (dias)	16 - 21	21
Alimentação diária recomendada (g)	3 – 6	10 – 20
Consumo médio de água (ml/dia)	3 – 7	10 – 35

Adaptado de MARQUES, 2005

Tabela 3.3. Valores de referência de parâmetros reprodutivos em ratos e camundongos

Parâmetro	Camundongo	Rato
Idade apta à reprodução	6 semanas	Macho: 70 dias Fêmea: 80 dias
Idade ideal para reprodução	7 a 8 meses	9 a 10 meses
Receptividade sexual	10 – 20 horas	10 – 20 horas
Repetição do cio	A cada 4 ou 5 dias e após o parto	A cada 4 ou 5 dias e após o parto
Período gestacional (dias)	19 – 21	20 – 22
Número de filhotes por ninhada	6 – 12	6 – 14
Tempo médio de vida (anos)	2 a 3	2,5

Fonte: MARQUES, 2005.

3.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os parâmetros bioquímicos podem variar de acordo com o equipamento usado na análise, com a técnica utilizada e com os cuidados na coleta e na manipulação das amostras. É importante utilizar equipamentos que permitam a obtenção de dados fidedignos, capazes de conferir resultados precisos com o volume de sangue adequado para o tamanho das amostras das espécies em estudo.

Tabela 3.4. Valores de referência de parâmetros hematológicos em ratos e camundongos

Parâmetro	Camundongo	Rato
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,6	7,3
Hemoglobina (g/dl)	14,2	15,2
Hematócrito (%)	45	45
VCM (μm^3)	51	62
CHCM (%)	33	34
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	9,9	9,8

Neutrófilos (x1.000)	1,8	1,9
Linfócitos (x1.000)	7,3	7,4
Monócitos (x1.000)	0,02	0,26
Eosinófilos (x1.000)	0,08	0,16
Basófilos	Raros	Raros
Plaquetas (x 10³/□l)	750	780
Reticulócitos (%)	≤2,0	≤0,7

HAU, VAN HOOSIER, 2002

Tabela 3.5. Valores de referência de parâmetros bioquímicos em ratos e camundongos

Parâmetro	Camundongo	Rato
Ácido úrico (mg/ dl)	1,7 – 5,4	0,8 – 4,4
Amilase (UI/l)	1.691 – 3.615	326 – 2.246
Bilirrubina total (mg/dl)	0,1 – 0,9	0,1 – 0,7
Cálcio (mg/dl)	5,9 – 9,4	5,3 – 11,6
CK (UI/l)	68 – 1.070	48 – 340
Cloro (mmol/l)	92 – 120	96 – 107
Colesterol (mg/dl)	36 – 96	20 – 92
Creatinina (mg/dl)	0,2 – 0,8	0,05 – 0,65
Fosfatase alcalina (UI/l)	62 – 209	16 – 302
Fósforo (mg/dl)	6,1 – 10,1	5,8 – 11,2
Glicose (mg/dl)	90 – 192	50 – 135
LDH (UI/l)	1.105 – 3.993	167 – 1.428
Potássio (mmol/l)	4,6 – 8,0	4,0 – 5,9
Proteína total (g/ dl)	3,6 – 6,6	5,3 – 6,9
Albumina (g/dl)	2,5 – 4,8	3,8 – 4,8
Globulina (g/dl)	≤0,6	1,8 – 3,0

Sódio (mg/dl)	124 – 174	135 – 146
Triglicerídeos (mg/dl)	55 – 144	27 – 108
AST (UI/l)	59 – 247	39 – 111
ALT (UI/l)	28 – 132	20 - 61

Adaptado de MARQUES, 2005

3.4 REFERÊNCIAS

MARQUES, R. G. **Técnica operatória e cirurgia experimental**. Rio de Janeiro: Guanaanabara Koogan, 2005.

SIROIS, M. **Medicina de Animais de Laboratório**: Princípios e procedimentos. São Paulo: Editora Roca, 2007.

LAPCHIK, V.B. V.; MATTARAIA, V.G. M.; KO, G. M. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DA DOR, ANALGESIA E ANESTESIA EM RATOS E CAMUNDONGOS

*Nathallya Pessoa Rodrigues do Ó
Felipe Freitas Diniz de Lima
Jaime José da Silveira Barros Neto*

4.1 INTRODUÇÃO

A insuficiência de informações com relação às doses e a falta de atenção aos animais de laboratório permitiram que o uso de analgesia e anestesia se tornassem obsoletos em procedimentos experimentais até o ano de 1980. As primeiras escalas de dor surgiram após o ano de 1990 com o surgimento da analgesiometria.

Os estímulos dolorosos em animais ocorrem pelos mesmos mecanismos nervosos que existem nos seres humanos, sendo de extrema importância que se erradique o pensamento de que eles são tolerantes à dor. Na natureza, os animais agem de acordo com o ambiente, em busca de manter a sua homeostase. Já no biotério, qualquer alteração nas condições de confinamento pode

se transformar em fator estressante. (OLIVEIRA, 2010; LAPCHIK, *et al*, 2010).

A presença de dor permite que o animal apresente uma cura prejudicada para determinados procedimentos, diminuição na ingesta de alimentos e aumento de consumo de energia, gerando um quadro energético negativo, atrasos na recuperação pós-anestésica, maior complicações no pós-operatório e respiração menos eficiente.

Em animais de laboratório existem diferentes parâmetros para avaliar a dor ou angústia, dentre eles estão o peso corporal, volume minuto da respiração, mobilidade, vocalização e comportamento na administração de analgésicos, sendo necessário que se conheça a biologia destes animais antes do experimento. A exteriorização do estado de saúde se dá pelo comportamento dos indivíduos quando estes se encontram isolados ou em grupos, por isso é necessário conhecer as características comportamentais de cada espécie utilizada em experimentos científicos, contribuindo para as avaliações diárias no desenvolver da pesquisa. (OLIVEIRA, 2010).

O *International Association for the Study of Pain, ISAP*, definiu a dor como sendo uma "sensação desagradável e uma experiência emocional associada com um dano tecidual potencial ou real".

Em decorrência da dor ocorrem várias alterações fisiológicas que interferem nos eixos neuroendócrinos, aumentando os níveis de aldosterona, cortisol e catecolaminas, podendo acarretar alterações em resultados do estudo.

Logo, o pesquisador por necessidade e por ética deverá evitar a dor em qualquer experimento com animais.

4.2 AVALIAÇÃO DA DOR

A avaliação da dor e analgesia em animais de laboratório é feita indiretamente, analisando atitudes comportamentais e dados fisiológicos. As escalas utilizadas para essa avaliação e na graduação da dor são a análoga visual, a numérica e a descritiva, sendo esta última considerada a mais prática e objetiva.

A escala descritiva utiliza quatro categorias para a graduação da dor: a ausência de dor, dor leve, dor moderada e dor grave. Sendo essa análise acompanhada de uma avaliação geral do animal, segundo alguns critérios. (LAPCHIK *et al.*, 2010)

A aparência e condição física em que é feita através da inspeção é um dos critérios para avaliação geral do animal em que o experimentador avaliará visualmente se há piloereção, postura encurvada, presença de secreções oculares ou nasais, ausência de pelos e automutilação. Também faz-se a palpação verificando a presença de dor.

O consumo de água e alimentos estará alterado quando há presença de dor observando uma redução desses consumos indicando alterações homeostáticas no animal (quando há redução do consumo de água), podendo gerar desidratação. A ausência do consumo de alimentos

poderá indicar problemas bucais ou desconforto por fatores estressantes.

Os sinais clínicos da dor observados na dor aguda serão uma postura de guarda do animal, vocalizações com ou sem o toque, posições anormais, além de automutilações. Já na dor crônica observa-se perda de peso, apatia, anorexia, disquesia e também podem levar à automutilações.

Dentro os sinais fisiológicos podemos perceber na presença da dor um aumento da frequência cardíaca ou respiratória, ocorrendo um acréscimo na frequência de movimentação do flanco. O perfil imunológico do animal poderá estar deprimido acarretando susceptibilidade à infecções.

Um animal com dor ou estresse é pobre de pesquisa visto as variações de neurotransmissores e responder hormonais em vigência da dor. É necessário sempre ter em mente que intervenções consideradas dolorosas nos seres humanos também serão dolorosas no animal. (MATTARAIA, 2010)

4.3 ANALGESIA

Os analgésicos são divididos em dois grupos opioides ou narcóticos e drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES). Ambos agem bloqueando a sensação de dor. Os opioides são de curta geração e agem a nível cerebral modificando a percepção da dor pelo organismo o que reduz a hipersensibilidade. Eles promovem analgesia e sedação e como efeitos colaterais podem provocar depressão respiratória e alguns efeitos gastrointestinais.

Os AINES são de longa duração, também atuam centralmente, bloqueiam a cadeia da cox, enzima presente em processos inflamatórios que atuam na produção de mediadores como prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Limitam a informação nociceptiva e periféricamente diminuem a inflamação. (POMPEU, 2010)

4.4 ANESTESIA

Quanto à anestesia, o pesquisador deverá ficar atento à seleção adequada do anestésico, biologia do animal utilizado e tempo de procedimento para cada experimento, tendo um compromisso de garantir supressão máxima do estresse em animais e em procedimentos dolorosos. O manipulador das substâncias anestésicas deverá conhecer os seus efeitos e procedimentos de biossegurança ao manipulá-las. (CHORILLI, 2007)

A escolha do fármaco é um dos fatores determinantes na qualidade da indução anestésica, no transoperatório e na recuperação do pós-operatório. Dentre os grupos de anestésicos teremos os inalatórios e os injetáveis.

Os anestésicos inalatórios proporcionam um maior controle do plano anestésico, um retorno rápido da anestesia quando comparada a endovenosa e intramuscular, uma metabolização

e eliminação do agente anestésico inalatório de modo rápido e um consumo de anestésico baixo, sendo assim econômico. Eles exigem uma câmara anestésica, atendendo a cada espécie estudada.

Os anestésicos injetáveis apresentam diversas características em suas composições, dessa forma a via de administração deverá ser baseada nessas características químicas de cada composto.

Junto aos anestésicos existirá a medicação pré-anestésica permitindo uma indução anestésica segura, reduzindo o estresse do animal, a dor pós-cirúrgica e facilitando a recuperação. Esses fármacos compreendem os anticolinérgicos, bloqueadores adrenérgicos, tranquilizantes, hipnóticos, neuroleptoanalgésicos e analgésicos narcóticos. Animais de laboratório costumam receber anestesia geral e as variáveis que afetam esse tipo de anestesia compreendem a idade do animal, saúde, espécie, raça ou linhagem e ambiente. A dosagem da medicação deve ser feita em particular para cada animal, obtendo assim o resultado desejado (LAPCHIK, *et al.*, 2010).

Durante a anestesia a profundidade que os fármacos atingem deverá ser analisada, verificando as respostas aos estímulos dolorosos, como o pinçamento do dedo ou da cauda; reflexos oculares, avaliando reflexos palpebrais, nistagmos ou posição do globo ocular; alterações cardiopulmonares e temperatura corporal. Dentre as observações clínicas, teremos a coloração da mucosa e tempo de preenchimento capilar (1 a 2 segundos), balanceamento hídrico e hipotermia (queda de 10°C entre 15 e 20 minutos) (NEVES, *et al.*, 2013).

Em procedimentos cirúrgicos feitos em cobaias, é importante o emprego de Atropina 0,05 mg/kg de peso, via SC, diminuindo as secreções salivares e brônquicas, já que as vias aéreas desses animais são estreitas e propensas à obstruções. Alguns procedimentos que envolvem dor e necessitam de anestesia incluem cirurgias, agentes que envolvem inflamação excessiva e necrose e coleta de sangue pelas vias intracardíacas e periorbital. (POMPEU, 2010)

Os roedores são as cobaias mais difíceis em se obter uma anestesia segura e eficaz.

Em ratos, a monitorização para analisar os estágios da anestesia é dificultada, sendo a transição de um estágio para o outro sutil e breve. São usadas para essa espécie as reações do sistema neuromuscular. O pinçamento do dedo e a análise da frequência respiratória são apropriados para avaliar o grau de anestesia. O movimento do bigode e das orelhas em resposta ao sopro indicará sedação mínima; a não retração de uma pata ou da cauda em resposta ao pinçamento indicará anestesia cirúrgica e a frequência respiratória abaixo de 60 respirações por minuto indicará uma depressão significativa do sistema nervoso central. (SIROIS, 2007).

Os anestésicos inalatórios comumente usados em ratos e camundongos incluem o halotano, metoxiflurano e isoflurano. O halotano causará uma anestesia profunda em pouco tempo. A aplicação poderá ser feita através de uma máscara por meio de uma máquina padrão de anestesia ou em colocando o animal em uma câmara de indução. Já os anestésicos injetáveis utilizados em ambas as espécies abrangem os barbitúricos (pentobarbital e tiamilal) e os agentes dissociativos (cetamina). (SIROIS, 2007).

Tabela 4.1. Anestésicos Inalatórios para Ratos e Camundongos

Anestésico	Concentrações para Indução da anestesia (%)	Concentração para Manutenção da Anestesia (%)	Concentração Alveolar Mínima (Potência Relativa do Agente)
Enflurano	3,5	1-3	-
Halonato	4	1-2	0,95
Isoflurano	4	1,5-3	1,38
Metoxiflurano	3	0,4-1	0,22

Fonte: Flecknell, 1996.

Tabela 4.2. Anestésicos Injetáveis para Ratos e Camundongos

Fármaco	Dose	Efeito	Duração (min)	Período de Hipnose (min)
Hidrato de cloral	400 mg/kg, IP	Anestesia cirúrgica	5	10
Fentanil + diazepam	0,5 mg/kg IP + 2,5/kg IP	Anestesiacirúrgica	20-40	120-240
Fentanil + medetomidina	300 µg/kg + 300 µg IP	AnestesiaCirúrgica	60-70	240-360
Quetamina/acepromazina	75 mg/kg + 2,5 mg/Kg IP	Anestesia ligeira	20-30	120
Quetamina + diazepam	75 mg/kg + 5 mg/kg IP	Anestesia ligeira	20-30	120
Quetamina + midazolam	75 mg/kg + 5 mg/kg IP	Anestesia ligeira	20-30	120
Quetamina + medetomidina	75 mg/kg + 0,5 mg?kg IP	Anestesia cirúrgica	20-30	120-240
Quetamina + Xilazina	75-100 mg/Kg + 10 mg/kg IP	Anestesia cirúrgica	20-30	120-240
Pentobarbital	40-50 mg/kg IP	Anestesia ligeira	15-60	120-240
Tiopental	30 mg/kg IV	Anestesiacirúrgica	10	15
Tiletamina + zalezepam	40 mg/kg IP	Anestesia ligeira	15-25	60-120

Fonte: Flecknell (1996); IACUC (2003).

4.5 REFERÊNCIAS

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11-23, 2007.

LAPCHIK, V.B. V.; MATTARAIA, V.G. M.; KO, M. G. **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2010.

NEVES, S. M. P.; MANCINI FILHO, J.; MENEZES, E. W. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. FCF-IQ/USP, São Paulo, 2013.

OLIVEIRA, T. K. B.; GONÇALVES, C. C.; ARAGÃO, A. D. S.; ALMEIDA, I. B. Requisitos e normas de um biotério em uma instituição de ensino superior. **Revista Tema**, Campina Grande, vol 12, n° 17, Julho/Dezembro 2011.

PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador. 2005.

POLITI, F. A. S.; MAJEROWICZ, J.; CARDOSO, T.A.O.; PIETRO, R.C.L.R.; SALGADO, H.R.N. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p. 17-28, 2008.

SIROIS, Margi. **Medicina de Animais de Laboratório: Princípios e procedimentos**. São Paulo: Editora Roca, 2007.

CAPÍTULO 5 - ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS E COLETA DE FLUIDOS EM RATOS ECAMUNDONGOS

*Nathallya Pessoa Rodrigues do Ó
Felipe Freitas Diniz de Lima
Thárcia Kiara Beserra de Oliveira
Fabiana Faxina*

5.1 INTRODUÇÃO

Experimentos com animais em pesquisas científicas têm contribuído sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e tecnologia, promovendo a descoberta de medidas profiláticas e tratamento de enfermidades que acometem os seres humanos (CHORILLI, M. 2007).

A análise de índices obtidos através da administração de medicamentos e coleta adequada de fluidos corpóreos em estudos *in vitro* e *in vivo* em experimentos com animais de laboratório

relaciona-se diretamente com a validade dos resultados obtidos. Vários métodos eficientes estão disponíveis. Este capítulo tem como objetivo apresentar as principais vias de administração e coleta de fluidos nas práticas de biotério em ratos e camundongos, levando como base o bem estar animal e a correta efetivação dos procedimentos realizados (PAIVA, 2005).

5.2 VIAS E LOCAIS DE ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS

Para que a administração dos medicamentos seja conduzida sem risco para o pesquisador e o animal, todos os animais devem ser corretamente imobilizados, sendo de fundamental importância que se aguarde o tempo necessário para que o animal se adapte a manipulação e torne-se familiarizado com o pesquisador e ao ambiente em que se encontra, visto que qualquer fator externo poderá causar alterações na homeostase e ser apontado com fator estressante, implicando desequilíbrio nas funções orgânicas e alterações fisiológicas que estarão diretamente relacionadas com o resultado da pesquisa (PAIVA, 2005).

Segundo o Curso de Manipulação de Animais de Laboratório oferecido pela Fundação Oswaldo Cruz, em 2005, é importante ressaltar que o estímulo luminoso produz variações nos níveis hormonais dos animais, logo, o ciclo reprodutivo de muitas espécies é controlado pelo ritmo circadiano imposto ao animal. Uma determinada dose de uma droga aplicada em diferentes horários do dia surtirão efeitos diferentes, devendo ser o horário para a realização de um experimento sempre específico e mantido durante toda a sua realização.

5.2.1 Administração por via oral (VO)

Na administração por via oral a substância é introduzida na cavidade oral ou no aparelho digestório por meio de um tubo esofágico ou estomacal. Um tubo flexível (ou agulha) com a ponta arredondada é introduzido na boca do animal e cuidadosamente empurrado pelo esôfago até o estômago. É necessário ser cauteloso para assegurar que o tubo não tenha penetrado inadvertidamente a traqueia, não sendo necessárias sedação ou anestesia (SIROIS, 2007).

Deve-se lembrar que os roedores ingerem alimento e água muitas vezes ao dia, e por isso dificilmente estão com o estômago vazio. A distensão máxima do estômago se dá ao final do período escuro, enquanto que à quantidade mínima no final do período claro. Logo, pequenos volumes devem ser administrados no início do período claro (fase de repouso).

Medicações que são administradas por via oral são primeiramente absorvidas pela circulação portal antes de se mover para a circulação sistêmica. Não se aconselha colocar medicações nas vasilhas de água porque o animal se recusará a beber água e ficará doente. Quando medicações tiverem de ser colocadas nas fontes de água para tratamento de grande

número de animais, recomenda-se a adição de pequena quantidade de açúcar ou melado (5mL/L para ratos) para tornar a solução mais palatável, ou a medicação poderá ser misturada ao alimento se os animais estiverem sendo alimentados com uma dieta em pó ou farelo.

Para administração de medicamentos em ratos através dessa via, os tamanhos apropriados das agulhas de alimentação variam de 16 a 18G e 5 a 7,5 de comprimento. O animal deve ser firmemente contido, com os dedos polegar e indicador para segurar a cabeça no lugar. A agulha é lubrificada, geralmente com o material a ser administrado, e então colocada no diastema da boca. Gentilmente avança-se a agulha ao longo do palato superior até alcançar o esôfago, devendo a agulha passar facilmente dentro do esôfago. (PAIVA, 2005)

Quando a agulha começa a se mover ao longo do esôfago, o animal poderá deglutir. Uma vez verificada a colocação no local adequado, o material pode ser administrado com uma seringa acoplada no final da agulha, devendo esta não ser rotacionada quando estiver colocada, porque a ponta pode romper o esôfago. Para se usar um cateter de borracha flexível (8Fr) para sondar o rato, primeiramente deve-se colocar um espéculo oral, para evitar que o animal morda o tubo.

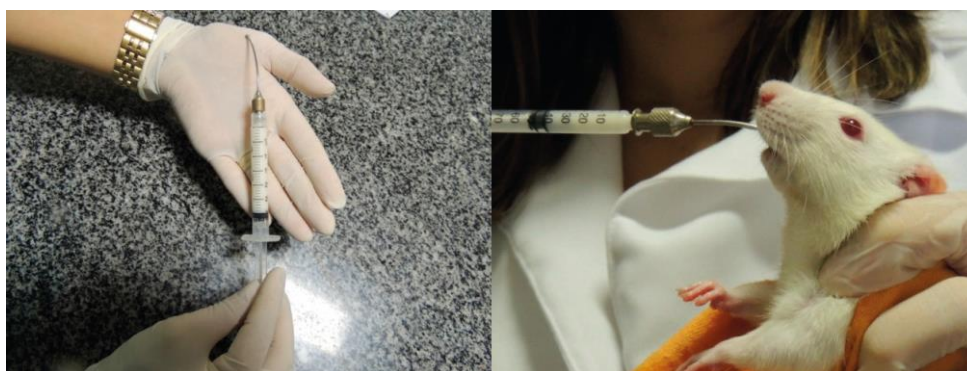


Figura 5.1. Procedimento de administração oral com agulha de gavagem.
Fonte: Núcleo de Investigação Experimental – FCM - Campina Grande

Os camundongos também podem receber medicação por via oral com uma agulha de alimentação com ponta de esfera. Sendo esse o método de preferência para animais individuais. A agulha adequada é de 20G e 3,75cm. O camundongo deve ser firmemente contido na palma da mão, devendo-se ter cuidado para estender-lhe o pescoço durante o procedimento e assegurar-se que o animal não se mova. A realização desse procedimento também segue os mesmos passos da administração por via oral em ratos. (SIROIS, 2007)

5.2.2 Administração por via subcutânea (SC)

Esta via é frequentemente usada com o tempo de absorção dependente da formulação a ser injetada, não sendo necessária anestesia ou sedação. Apunção deve observar o sentido do pelo no meio de uma prega na pele,

Em ratos as injeções são administradas com agulha de 21G ou menor. O animal pode ser contido na mesa ou ser colocado numa tampa de gaiola de metal que lhe permita agarrar as barras. Usualmente, é administrada na pele solta sobre a nuca ou formando uma "tenda" puxa-se gentilmente a pele do abdome. A agulha deverá ser inserida em ângulo de 90° com a pele e ser direcionada ao espaço subcutâneo abaixo da pele "em tenda", injetando o material em movimento leve (CHORILLI, 2007).

Em camundongos as injeções por via subcutânea são facilmente realizadas por uma só pessoa. Para isso, o animal também poderá ser colocado sobre uma tampa de gaiola de metal que lhe permita agarrar as barras ou ser colocado diretamente na mesa, isso permitirá que se puxe gentilmente a pele solta sobre a nuca, local em que será introduzida a agulha no espaço subcutâneo ou ao ser contido por um manipulador, a pele do abdome, assim como em ratos, poderá ser utilizada. Uma das vantagens na administração na região da nuca é que a correta manipulação restringe o movimento da cabeça do animal, impedindo-o de se virar e morder (CLORILLI, 2007).

5.2.3 Administração por via intramuscular (IM)

Na administração por via intramuscular, devem ser empregadas agulhas de tamanho similar às empregadas nas injeções subcutâneas e a profundidade no tecido deve ser de aproximadamente 5mm. A administração intramuscular pode ser dolorosa, pois as fibras musculares ficarão sob a tensão da substância que fora injetada. O local a ser administrado deverá ter a menor probabilidade de atingir terminações nervosas, devendo-se evitar também vasos sanguíneos e estruturas ósseas, logo, antes de injetar deve-se assegurar que a agulha não está em um vaso sanguíneo, exercendo uma leve pressão de retirada no êmbolo da seringa (SIROIS, 2007).

Em relação à velocidade de absorção, deve-se distinguir formulações aquosas e oleosas, essa última permanece depositada por mais de 24 horas no sítio muscular injetado.

Em ratos, a administração de injeções intramusculares poderá ser complicada devido à pequena massa muscular. Os principais grupos musculares utilizados são quadríceps, glúteos e tríceps, devendo ser injetados pequenos volumes. A agulha utilizada deverá ter calibre de 22G ou menos, a pele deverá ser limpa, a musculatura estabilizada e separada de estruturas adjacentes com pinçamento dos dedos, uma vez feito isso, a agulha deverá ser direcionada em ângulo reto à parte mais profunda do músculo, o êmbolo da seringa deverá ser levemente puxado

para verificar se não foi atingido nenhum vaso sanguíneo, na ausência de retorno sanguíneo, injeta-se a substância em um movimento lento e firme. Após a agulha ser retirada deve-se aplicar pressão no local por alguns segundos.

Em camundongos as injeções intramusculares também são dificultadas devido à pequena massa muscular. Para a administração por essa via, o animal deverá ser contido na mesa e injeta-

se o material no músculo quadríceps da perna traseira para volumes muito pequenos. Não se deve administrar substâncias irritantes por essa via.

5.2.4 Administração por via endovenosa (EV)

A administração por essa via é feita diretamente na corrente sanguínea, por meio de vasos superficiais. Serão administradas substâncias aquosas, não irritantes, lembrando que nunca deverá ser aplicado medicamentos diluídos em veículo oleoso, pois pode gerar êmbolos no animal e consequentemente a morte do mesmo (PAIVA, 2005)

Em ratos as injeções endovenosas podem ser ministradas nas veias safena, jugular, femoral ou lateral da cauda, esta última é utilizada para injeções de pequenos volumes e as três primeiras necessitam que o animal esteja anestesiado. Essas veias encontram-se ao longo de cada lado da cauda e são razoavelmente superficiais. Para o procedimento, deve-se conter o animal e ocluir as veias aplicando pressão na base da cauda. O rato pode ser contido em um aparato plástico de contenção ou cone ou o cuidador pode segurar o animal enquanto um assistente administra a medicação. A cauda deverá ser limpa e a agulha a ser injetada deverá ser de pequeno calibre, 22G ou menos, estando acoplada a um cateter do tipo borboleta quase paralelo à cauda ao lado da veia. A cauda deverá ser segurada firmemente e a agulha inserida no lúmen da veia no nível do meio da cauda, com um movimento suave. Retira-se o êmbolo da seringa levemente e verifica-se a correta colocação na veia. Após isso a medicação será injetada lenta e suavemente. Ao retirar a agulha da veia, é necessário aplicar pressão no local em que foi feita a venipunção para garantir a homeostase. Quando forem necessárias repetidas administrações por essa via, pode-se colocar cirurgicamente um cateter jugular (LAPCHIK et al., 2010; PAIVA, 2005).

Em camundongos a administração endovenosa não é comum, pois o animal precisa estar anestesiado, além de a contenção mantida ser difícil, mesmo com aparatos. Quando necessária à administração também é feita por veias da cauda, contendo o animal e aplicando pressão em sua base. A seringa com agulha acoplada deverá ter pequeno calibre (22G ou menos) ou poderá ser usado um cateter do tipo borboleta quase paralelo à cauda ao lado da veia. Antes de inserir a agulha, a cauda deverá ser limpa. Após isso, segura-se firmemente e insere a agulha no lúmen da veia ao nível da metade da cauda, suavemente. Puxando-se o êmbolo para verificar a correta colocação, a medicação poderá ser injetada lentamente. Ao retirar a agulha, recomenda-se aplicar pressão no local da venipunção, assim como nos ratos, garantindo a homeostase (CLORILLI, 2007).

5.2.5 Administração por via intraperitoneal (IP)

Nas injeções intraperitoneais há risco em puncionar o trato intestinal por dificuldade na

contenção do animal. Não são indicadas para administração de substâncias irritantes, podendo causar peritonite.

A administração IP é feita no flanco, no quadrante inferior esquerdo, em ratos, e direito, em camundongos. Para que ocorra um melhor resultado, deve-se inclinar a cabeça do animal para baixo, isso ajuda os órgãos do abdome a se acomodarem, impedindo que ocorra alguma perfuração. Caso ocorra perfuração, a agulha e seringa deverão ser descartadas e o processo reiniciado.

Em ratos as administrações por essa via são bastante simples. O animal deverá ser contido com compressão da nuca entre as mandíbulas ou com o corpo contido abaixo dos cotovelos, e a sua cauda é comprimida entre os dedos da mão que está segurando o corpo. Mantém-se o rato de modo que sua cabeça fique inclinada para baixo, em aproximadamente 30°. O calibre da agulha que é usada é geralmente 22G ou menor. Assim como na administração intramuscular, devemos puxar o êmbolo da seringa para verificar se não houve puncionamento de algum vaso sanguíneo ou órgão interno. Não havendo fluido, o material poderá ser injetado (SIROIS, 2007).



Figura 5.2. Aplicação intraperitoneal, quadrante inferior esquerdo.
Fonte: Núcleo de Investigação Experimental – FCM - Campina Grande

Em camundongos as administrações IP são comumente realizadas por uma só pessoa. A contenção é feita segurando uma quantidade generosa de pele solta entre as mandíbulas e colocando-o na palma da mão com a cauda presa entre os dedos. A agulha utilizada tem calibre menor que 23G. A realização ocorre da mesma maneira que em ratos, contudo devemos lembrar que nessa espécie a administração é feita no quadrante inferior direito do abdome (SIROIS, 2007).

Tabela 5.1. Volumes máximos sugeridos para injeção em ratos e camundongos

Vias de administração	Ratos	Camundongos
Via Oral (VO)	-	-
Via Subcutânea (SC)	5mL/kg	10 mL/kg de peso corporal
Via Intramuscular (IM)	0.1 mL/local	0,05 mL/local
Via Endovenosa (EV)	5mL/kg	10 mL/kg de peso corporal
Via Intraperitoneal (IP)	10 mL/kg	20 mL/kg de peso corporal

5.3 COLETA DE FLUIDOS

A fonte e o método de coleta podem afetar os parâmetros sanguíneos. A quantidade máxima de sangue que deve ser coletada de uma só vez deverá ser 1% do peso corporal. O local da coleta deverá ser alternado e deverá ser dado o intervalo de 3 a 4 semanas para uma nova realização.

Para a remoção de um volume sanguíneo acima do recomendado, deverá ser feita uma reposição de fluido enquanto o sangue é coletado. O volume de sangue removido deverá ser substituído lentamente, morno, via intravenosa (caso não esteja disponível, usa-se as vias peritoneal ou subcutânea) e o volume de fluido deverá ser o dobro do volume sanguíneo coletado.

Após a coleta, os animais deverão ser observados quanto ao distresse ou anemia e cuidados com o local da punção, verificando trauma, infecção ou irritação.

Geralmente são utilizados pequenos tubos plásticos de 2mL contendo anticoagulantes como EDTA. Tubos contendo heparina, citrato ou oxalato de potássio são utilizados para a coleta do plasma e para a análise do soro os tubos apresentam-se sem coagulante. Amostras de sangue para processamento de plasma ou soro podem ser centrifugadas em aproximadamente 800 a 1000X durante 10 a 15 minutos, ou deixando a amostra à temperatura ambiente, em 30 minutos é possível separar a fração líquida da fração celular (LAPCHIK *et al.*, 2010).

5.3.1 Coleta em ratos

Em ratos a coleta de amostras de sangue vai depender de alguns parâmetros como o volume sanguíneo necessário, a idade do animal e o nível de habilidade técnica de quem vai realizar a coleta. A retirada de volume total de sangue não deve exceder mais que 10% do volume sanguíneo total e em ratos doentes essa quantidade diminui significativamente.

Para obter pequenos volumes de sangue, poderá ser realizado o corte da unha. A coleta venosa permite a obtenção de volumes moderados de sangue. Os locais comumente utilizados são as veias laterais da cauda, não sendo necessária anestesia e necessitando que o animal seja contido firmemente. Para a sua realização a cauda é esfregada com álcool e seca. O vaso sanguíneo deverá ser ocluído e para isso aplica-se uma pressão sobre a veia na base da cauda. Para penetrar na veia poderá ser usado uma seringa de tuberculina, uma seringa de 1mL com agulha de pequeno calibre ou um cateter do tipo borboleta de pequeno calibre. O local para entrar no vaso encontra-se no terço ou metade da distância entre a cauda e o corpo, penetrando em ângulo raso. Para ajudar a estabilizar o vaso a cauda poderá ser contida com um bloco de madeira inferiormente ou com os dedos de quem está realizando a coleta. A amostra deverá ser puxada lentamente evitando o colapso ou constrição da veia. Para garantir a hemostasia também é necessário aplicar pressão no local da punção venosa (LAPCHIK *et al.*, 2010).

A coleta de sangue através do plexo retroorbital sempre deverá ser feita com o animal anestesiado para evitar traumas maiores e aplicando-se lubrificante oftálmico em pequena quantidade, evitando o ressecamento corneal. Para a realização dessa coleta, as pálpebras superior e inferior deverão ser mantidas abertas com a mão. A abordagem deverá ser feita dorsolateralmente, colocando uma pipeta de Pasteur ou um tubo capilar dentro da órbita. O ponto para inserção deverá ser levemente dorsal ao canto medial, deslizando a pipeta ou o tubo pelo lado e atrás do globo ocular. Com a inserção correta, o sangue fluirá para o tubo, caso não ocorra o tubo deverá ser puxado levemente. Após a coleta, as pálpebras devem ser mantidas fechadas e usando uma gaze, deve ser feita uma leve pressão sobre o olho do animal (SIROIS, 2007).

A coleta de sangue do coração ou veia cava é feita como procedimento terminal, com o animal anestesiado, pela probabilidade de danos cardíacos nessa coleta. O rato poderá ser posicionado em decúbito lateral ou dorsal. No primeiro caso, o coração é penetrado logo caudalmente ao cotovelo e no segundo caso a inserção da agulha é feita pelo abdome, em direção cranial ao coração e lateral ao processo xifoide (LAPCHIK *et al.*, 2010).



Figura 5.3. Coleta de sangue no coração.

Fonte: Núcleo de Investigação Experimental – FCM - Campina Grande

5.3.2 Coleta em camundongos

Em razão do seu pequeno tamanho, volume sanguíneo e baixa pressão sanguínea, a coleta de sangue é complicada. Os volumes de sangue que podem ser retirados são muito pequenos na maioria dos locais. Com exceção do corte da cauda, as outras técnicas de coleta necessitam que o animal esteja anestesiado. Para a maioria dos propósitos com volume sanguíneo adequado, recomenda-se o seio retroorbital para a coleta. Para outros locais, a coleta de volume sanguíneo considerável deverá ser seguida por eutanásia (POLITI *et al.*, 2007).

O corte da unha e da cauda segue os mesmos padrões aplicados em ratos. A contenção deve ser feita de maneira adequada, além da antisepsia com o álcool nos locais da coleta. Deverá ser cortado apenas uma ponta da unha e o sangue coletado em um tubo capilar, evitando o excesso

de pressão e conseguinte contaminação com fluido de tecido. Para o corte da cauda, deve-se aquece-la antecipadamente, aumentando o fluxo sanguíneo. Esse aquecimento deverá ser feito com água quente ou uma lâmpada aquecida.

Deverá ser aplicada pressão na base da cauda e cortado apenas um pequeno pedaço da ponta. A hemostasia deverá ser feita aplicando pressão ou pó hemostático antes do animal retornar para a gaiola.

Para a coleta sanguínea através das veias laterais da cauda recomenda-se que o animal esteja anestesiado. O local para a coleta deverá ser limpo com álcool, aguardando a secagem. Assim como no corte, a cauda deverá ser aquecida e a oclusão do vaso deverá ser feita aplicando-se pressão em sua base. A estabilização deverá ser feita com um bloco de madeira ou posicionando os dedos embaixo da cauda. A agulha utilizada deverá ter pequeno calibre e estar sem a seringa acoplada, mantendo-a paralela ao vaso. Para entrar no vaso deverá ser feita uma movimentação suave e o sangue poderá ser coletado diretamente no bulbo da agulha. Após o procedimento, segue-se com a hemostasia retornando o animal para a gaiola. A coleta através da artéria dorsal da cauda também poderá ser utilizada. (SIROIS, 2007)

A coleta através do seio retroorbital deverá ser feita com o animal anestesiado. Para prevenir a dessecação corneal, aplica-se uma pequena quantidade de lubrificante oftálmico. Para a realização da coleta, as pálpebras superior e inferior deverão ser mantidas abertas com uma mão. O tubo capilar deverá ser abordado dorsolateralmente e colocado num ponto do canto medial, dentro da órbita, deslizando pelo lado e atrás do globo. O tubo deverá ser avançado através da membrana conjuntival, devendo o sangue fluir sem dificuldades, caso não ocorra, puxa-se levemente o tubo. Após a coleta, aplicando-se levemente pressão com uma gaze, mantendo o olho fechado.

A cardiocentese é realizada da mesma forma que nos ratos, lembrado que sempre em procedimentos terminais e anestesiados (CHORILLI, 2007; PAIVA, 2005).

5.4 REFERÊNCIAS

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11-23, 2007.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

NEVES, S. M. P.; MANCINI FILHO, J.; MENEZES, E. W. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. FCF-IQ/USP, São Paulo, 2013.

PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de Manipulação de Animais de**

Laboratório. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador. 2005.

POLITI, F. A. S.; MAJEROWICZ, J.; CARDOSO, T.A.O.; PIETRO, R.C.L.R.; SALGADO, H.R.N. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p. 17-28, 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE. **Biotério:** Anestesia. 2014. Disponível em: <http://www.ufcspa.edu.br/ufcspa/pesquisa/bioterio/orientacoes_bioterio.pdf>. Acesso em: 01 set 2014.

CAPÍTULO 6 - ESTRESSE EM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

*Maria Priscila Mendes Muniz Falcão
Thárcia Kiara Beserra de Oliveira
Francisco de Assis Cardoso Almeida
Bruno Adelino de Melo*

6.1. INTRODUÇÃO

O estresse representa a alteração da homeostase no indivíduo mediante a ação de agentes internos e externos, com consequente reação fisiológica. A resposta do organismo ao estresse possui uma explicação evolutiva, pois representa um mecanismo de defesa corporal que irá permitir a manutenção da vida e perpetuação da espécie.

O estressor consiste em qualquer circunstância que ameace ou que é percebida como nociva ao bem-estar do indivíduo. O estresse é, portanto, inerente a vida de todos os animais e os mecanismos regulatórios da homeostase corporal podem conseguir evitar o seu potencial danoso

(estresse classificado como eustress). Entretanto, quando o estresse torna-se prolongado ou ocorre uma resposta inadequada ao estímulo podem acontecer alterações endócrinas, metabólicas, auto-imunes e psiquiátricas (denominado de distress) (RIVERA, 2002).

A resposta adversa ao estímulo pode ser percebida por alterações comportamentais (agressividade, expressão facial, vocalização), sinais fisiológicos (alteração na temperatura corporal, nas fezes, na respiração, na frequência cardíaca, perda de peso), indicadores bioquímicos (corticóides, catecolaminas), sinais clínicos (aparência dos pelos, secreção dos olhos e nariz, redução da atividade exploratória) e até mesmo lesões patológicas (ulcerações gástricas, alterações renais, lesões cardiovasculares, hipertrofia e hemorragia da glândulas adrenais). As respostas mediadas pelos sistemas hormonais variam conforme as características, quantidade e experiências sociais que o roedor teve durante o seu desenvolvimento. O convívio social pode reduzir os efeitos de situações estressantes, comportamentos anormais, além de estímulo cognitivo (GOMES; SILVA, 2010).



Figura 6.1. Rato saudável. Pelagem homogênea e brilhosa, olhos com vivacidade e brilho.
Fonte: Núcleo de Investigação Experimental – FCM - Campina Grande

A resposta ao estressor pode ser ativa – o próprio animal tenta controlar a situação ou passiva – a situação é aceita de forma passiva pelo animal. Conforme a predisposição genética, traços individuais e o ambiente no qual está inserido a reação de diferentes animais ao mesmo estresse pode diferir (RIVERA, 2002). A resposta ao estresse possui como funções permitir ao indivíduo lidar de forma comportamental e fisiológica em situações adversas e conduzir ao aprendizado, a fim de que quando exposto a casos semelhantes o animal consiga reagir adequadamente.

6.2 BEM-ESTAR ANIMAL E ESTRESSE

O Bem-estar é uma característica do animal, depende da habilidade de manter sua condição corporal a mais estável possível e evitar o sofrimento, não é algo que possa ser

fornecido a ele, mas há como melhorá-lo.

O Bem-estar é avaliado por meio de características fisiológicas e comportamentais. Os indicadores fisiológicos estão atrelados ao nível de estresse, de modo que se o estresse aumenta, o bem-estar diminui; já as medidas comportamentais estão associadas principalmente a atitudes que se afastam do demonstrado pela maioria dos indivíduos (BROOM; MOLENTO, 2004).

Um estressor somente proporciona perigo ao Bem-estar quando retira recursos biológicos do animal, o que o predispõe ao perigo do desenvolvimento de doenças e alterações fisiológicas. Para que o animal de experimentação alcance um quadro de mínimo estresse e melhore seu bem-estar é necessário que seja assegurado a ele as "Cinco liberdades":

Liberdade Fisiológica: Ausência de fome e sede;

Liberdade Ambiental: Não existência de desconforto térmico ou físico;

Liberdade Sanitária: Ausência de injúrias e doenças;

Liberdade Comportamental: Possibilidade para expressar padrões de Comportamento normais;

Liberdade Psicológica: Falta de medo e ansiedade.

Essas cinco definições permitem avaliar quais dos aspectos estão sendo seguidos no sistema de criação e quais modificações devem ser adotadas para melhoria da qualidade de vida animal e resultado das pesquisas (FRAJBLAT; AMARAL; RIVERA).

6.3 ESTRESSE E PESQUISA CIENTÍFICA

A manutenção da integridade física e mental dos animais é importante não apenas para a melhoria da vida deles, mas para os próprios autores dos estudos experimentais, pois é fundamental para a qualidade e reprodutibilidade de um estudo, a padronização das condições ambientais e técnicas da pesquisa científica. Para um estudo ser considerado confiável é necessário que o pesquisador consiga excluir as variáveis que possam interferir nos resultados e dentre elas o estresse é uma variável em potencial (LAPECHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

Proporcionar um ambiente ausente de estresse não é possível e pode também não ser o melhor para o animal. Mediante o fato de que os animais de laboratório não vivem em seu habitat natural e boa parte dos fatores causadores do estresse pode ser manipulada pelo homem, adotando condutas específicas há chance de minimizar a ocorrência e consequências do estresse nos animais e de habilitá-los a enfrentar tais situações mais adequadamente.

6.4 RESPOSTA FISIOLÓGICA AO ESTRESSE

A reação fisiológica aos agentes estressores se divide em 3 episódios, descrita como a Síndrome de Adaptação. No primeiro estágio (Fase de reação de alarme) o reconhecimento do

agente estressor pela porção sensorial do organismo leva a estimulação do sistema límbico, o que resulta na ativação do Sistema Nervoso Simpático - SNS (com consequente liberação de Norepinefrina e Epinefrina) e também na ativação do hipotálamo, cursando com a secreção de Vasopressina e do Hormônio Liberador de Corticotrofi na (CRH). Estes são transportados para a hipófi se anterior, onde estimulam a liberação do Hormônio Adrenocorticotrófi co (ACTH) que ao atuar na zona fasciculada da glândula adrenal, promove maior secreção de glicocorticoides (TANNO; MARCONDES, 2002). As catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) e os glicocorticóides atuam estimulando a lipólise, proteólise, glicogenólise, impedindo a captação de glicose por tecidos cuja função não é essencial durante a exposição ao estressor. Além desses efeitos há ainda o aumento da frequência cardíaca e da sudorese, diminuição da digestão e imunossupressão. Essas alterações fi siológicas possibilitam ao animal uma resposta ao agente agressor, a qual pode ser de luta ou de fuga (BAUER, 2002).

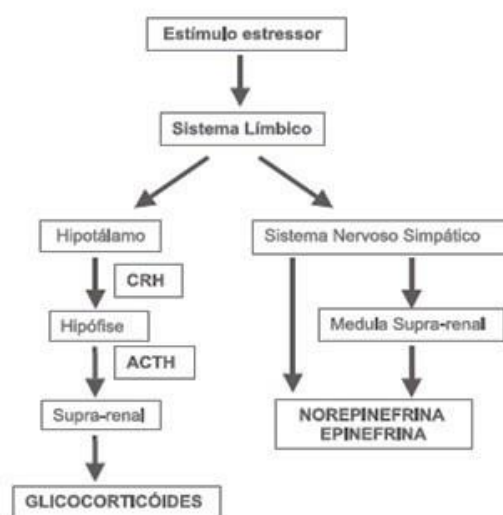


Figura 6.2. Ativação do sistema efetor estresse primário

Fonte: Damy et al, 2010.

Outros sistemas também estão relacionados as respostas adaptativas ao estresse, a exemplo do eixo hipotálamo-hipófi se-tireóide, respondendo as variações de temperatura, o eixo hipotálamo-hipófi se-gônadas, reduzindo a função reprodutiva para desviar energia para estruturas mais exigidas durante uma situação de estresse e o sistema renina-angiotensina levando a liberação de renina que juntamente aos estímulos do SNS promove o aumento da pressão arterial e permite a perfusão necessária a todo o organismo (TANNO; MARCONDES, 2002).

No segundo estágio (Fase de resistência) há o controle dos níveis hormonais, representando uma adaptação do organismo e caso o estresse permaneça vigente, ocorre o terceiro estágio (Fase de exaustão), no qual, surgem disfunções orgânicas como consequência da

imunodepressão mantida (BAUER, 2002).

6.5 CLASSIFICAÇÃO DO ESTRESSE

Os agentes estressores podem ser classificados mediante suas características como estressores físicos (temperatura, umidade, ruídos, iluminação), químicos (venenos, medicamentos, anestésicos), microbiológicos (patógenos) e sociais (relação de dominância) (LAPECHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

O estresse ainda pode ser avaliado quanto a sua duração, como agudo, estímulo que dura por um breve período de poucos minutos, horas ou dias ou crônico, o qual permanece por muitas horas e alguns dias, ou de maneira inversa. As respostas adaptativas a um agente estressor agudo incluem processos fisiológicos e comportamentais, que são essenciais para restabelecer o balanço homeostático, redirecionando a utilização de energia para os órgãos mais exigidos. No estresse crônico, os níveis aumentados de glicocorticóides por um longo período de tempo pode ter efeitos desfavoráveis ao organismo, como a diminuição da função do sistema catecolaminérgico, inibição da atividade da tireoideana e da secreção do hormônio do crescimento e interrupção do ciclo reprodutivo (TANNO; MARCONDES, 2002).

6.6 CAUSAS E MEDIDAS PREVENTIVAS AO ESTRESSE

6.6.1 Temperatura

Variações na temperatura podem alterar o bem-estar do animal, resultando em respostas metabólicas compensatórias, as quais afetarão os padrões normais de circulação, excreção, além de alterações comportamentais. Além disso, quando atingido níveis que não podem ser compensados pela capacidade regulatória do organismo do animal, pode-se aumentar a predisposição deste a quadros infecciosos, conduzindo-o a um estresse do tipo microbiológico. A fim de evitar o estresse advindo desse agente ambiental é fundamental o registro diário da temperatura ambiente, que para roedores deve ser mantida a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (DAMY *et al*, 2010).

6.6.2 Umidade

Variações extremas na umidade relativa podem levar a alterações patológicas nas vias respiratórias, na pele e infecções, além de modificar o consumo de ração e água, gerando conflitos entre os animais e consequentemente, estresse (POLITI *et al*, 2008). A umidade recomendada nas

salas deve ficar em torno de $45\% \pm 15\%$ (DAMY *et al*, 2010).

6.6.3 Iluminação

A luz através de estímulos ao sistema nervoso leva à produção e secreção de hormônios necessários ao processo regulatório do organismo, caso haja a quebra da homeostasia do animal, serão verificadas alterações comportamentais que irão interferir diretamente no seu bem-estar. No ambiente onde ficam os animais de experimentação, a intensidade da luz deve ser de luz 300 a 450 lux a 1 metro acima do piso, 600 lux a 1 m do teto, diretamente abaixo da fonte de luz. As gaiolas da prateleira superior devem ser protegidas da influência direta da luz. Os ciclos devem ser de 12/12 de luz e escuridão. Em animais albinos a intensidade da luz não deve exceder 60 lux dentro das gaiolas para não provocar distúrbios patológicos na retina e aumentar a atividade endócrina. A fonte de luz deve ser fria (a exemplo da lâmpada fluorescente) (DAMY *et al*, 2010).

6.6.4 Sons

O som conduzido pelo impulso através do SNC causa alterações em diferentes órgãos e sistemas no organismo (eleva a frequência cardíaca e respiratória e aumenta as respostas hormonais). Ruídos na sala em que o animal se encontra podem levar a reações adversas que podem levar a resultados alterados. Os ruídos devem estar abaixo de 60 dB (DAMY *et al*, 2010).

6.6.5 Superpopulação

Uma grande quantidade de animais em um mesmo espaço favorece casos de agressões e redução na reprodutibilidade. Além disso, uma superlotação leva ao excesso de concentração de amônia, o que predispõe a infecções respiratórias (LAPECHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

6.6.6 Transporte

Diversos indutores de estresse estão associados ao transporte, a exemplo dos indutores fisiológicos (acesso limitado à alimentação), psicológicos (exposição a um ambiente novo), e indutores físicos (iluminação, temperatura). Eles podem cursar com alterações cardíacas, metabólicas- os níveis de glicocorticóides ficam elevados por um a dois dias após o transporte, conduzindo a um quadro de perda de massa corpórea, reprodutivas, gerando resultados falseados na pesquisa. Fatores ainda que podem cursar com o estresse em roedores são o tempo de

transporte e quando admitidos em novos locais há também a questão da maior susceptibilidade a patógenos oportunistas. Cada transporte deve ser bem planejado, de modo a evitar temperaturas extremas, congestionamentos de trânsito, escolhendo ainda trajetos mais curtos (LAPECHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

Antes de iniciar o estudo experimental é necessário um período de adaptação e aclimação de cerca de três dias ao ambiente para que sejam reestabelecidas as condições fisiológicas do animal (LAPECHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

6.6.7 Gaiolas

As gaiolas devem conter o animal sem limitá-lo de efetuar movimentos e posturas típicas da espécie. A troca excessiva de gaiola gera estresse e leva a produção aumentada de feromônio e amônia, desregulando o seu equilíbrio fisiológico (DAMY *et al*, 2010).

A maravalha utilizada como forração para as gaiolas não deve apresentar substâncias químicas, como fungicidas ou inseticidas, e a madeira deve ser macia e absorvente, de forma que não libere substâncias nocivas ao fígado. Os resultados experimentais podem ser influenciados pela qualidade da maravalha e também pela higiene das gaiolas, por determinar em uma menor concentração de amônia no ambiente e menor estresse para o animal (DAMY *et al*, 2010).

6.6.8 Treinamento animal e humano

A adaptação dos animais após o transporte e exposição, a um novo ambiente, melhora a estabilização para o uso de animais no experimento. Como o estresse é um fator inevitável, a exposição prévia dos animais ao agente estressor é indicada. Essa situação pode ocorrer por um processo de desensibilização, em que os animais são reforçados a ter uma interação com um item específico ou pode acontecer por um processo passivo, no qual nenhum esforço de contingente é envolvido (LAPECHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

A manipulação adequada de todos os animais de laboratório é essencial para o seu bem-estar e saúde e confiabilidade dos resultados da pesquisa. O manuseio bem sucedido requer a habilidade em identificar o estado geral do animal (agressividade, dor, desconforto) a fim de modificar a técnica de abordagem. Pessoas em treinamento devem aprender a manusear utilizando primeiramente animais já acostumados a situação, adequando-se a força mínima necessária para segurar e conter de modo seguro o animal.

Para reduzir o nível de estresse do animal durante o manuseio é indicado (LAPECHIK; MATTARAIA; KO, 2009):

Evitar apresentar nervosismo, já que não é benéfico ao animal se estabelecer uma relação de desconforto;

Não apertar o tórax ou a garganta;
Não segurar com muita força ou realizar movimentos bruscos;
Não segurar o rato pela ponta da cauda, pois o animal irá se sentir em perigo e desenvolverá uma reação de luta ou de fuga;
Garantir a mesma técnica de manipulação a todos os animais envolvidos na pesquisa, a fim de que se obtenha um resultado com as mesmas condições de estresse.

6.7 REFERÊNCIAS

- BAUER, M. E. Estresse como ele abala as defesas do corpo. **Revista Ciência Hoje**, v. 30, n. 179, p. 25-25, 2002.
- BROOM, D.M.; MOLENTO, C.F.M. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.
- DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L. F. P.; Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-11, 2010.
- FRAJBLAT, M.; AMARAL, V.L. L.; RIVERA, E. A. B. Ciência em animais de laboratório. **Experimentação animal**. Disponível em: <<http://cceb.uncisal.edu.br/wp-content/uploads/2009/11/ciencias-em-anim-lab2.pdf>>. Acesso em: 10 set 2014.
- GOMES, C. M.; SILVA, J. A. **Fisiologia do estresse: aspectos neuroendócrinos e comportamentais**. Psicologia Animal, 2010. 11p.
- LAPCHIK, V.B. V.; MATTARAIA, V.G. M.; KO, M. G. **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 73-81.
- POLITI, F.A. S.; MAJEROWICZ, J.; CARDOSO, T.A. O.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H.R.N. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**. v. 29, n.1, p. 17-28, 2008.
- RIVERA, E. A. B. Estresse em Animais de Laboratório. In: ANDRADE, A.; PINTO, SC.; OLIVEIRA, RS. (Org.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. p. 263-272.
- TANNO, A. P.; MARCONDES, F. K. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 3, p. 273-289, 2002.