

Procedimentos para Anestesia de Animais de Laboratório – **CREAL/2013**

Conforme a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (2), pesquisadores e professores são responsáveis por todas as questões relacionadas ao bem-estar dos animais utilizados em ensino e pesquisa e devem agir de acordo com as exigências desta diretriz. Essa responsabilidade se inicia quando os animais são alocados em um Biotério de experimentação para uso em um projeto e se finaliza com o término do mesmo.

A dor e o *distresse* não são avaliados facilmente em animais e, portanto, todos os pesquisadores devem considerar que animais sentem dor de forma similar a humanos, a não ser que haja evidência em contrário (2,3).

Procedimentos cirúrgicos devem ser realizados com a anestesia adequada, local e/ou geral. A escolha e administração de agentes tranqüilizantes, analgésicos e anestésicos devem ser apropriadas para a espécie e para a finalidade do projeto de pesquisa aos quais os animais estão vinculados. Esses agentes devem ser administrados dentro do contexto do plano de controle da dor. O período pós-operatório deve proporcionar conforto e analgesia para o animal. Deve-se dar atenção à hidratação, alimentação, higiene, temperatura e ao controle de infecções (2).

Conforme a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos a eutanásia deve ser realizada em ambiente silencioso e longe de outros animais (2,3). A morte deve ser confirmada antes que o cadáver seja descartado. Para as cirurgias em que não houver recuperação, o animal deve permanecer anestesiado até a eutanásia. O animal que apresentar sinais clínicos de dor intensa e resistente a tratamento analgésico no período pós-operatório deverá ser submetido à eutanásia.

1. Métodos de Administração de Anestésicos

As duas principais vias de aplicação de anestésicos são a via parenteral e a inalatória (11). A duração da anestesia, por qualquer via é variável depende do metabolismo individual, idade, sexo e estado corporal do animal (7). Na **Tabela 7** está sumarizado o tempo de duração anestésica conforme o fármaco. As vias de administração parenteral utilizadas são: intraperitoneal (IP), intramuscular (IM), intravenosa (IV) e subcutânea (SC). Na **Tabela 1** estão descritas as vias e os volumes máximos administrados em ratos de acordo com a massa corporal. Os fármacos de uso inalatório podem ser administrados através da vaporização controlada ou através da respiração espontânea. Preferencialmente a anestesia inalatória deve ser utilizada em procedimentos com duração superior a 30 minutos (14). As limitações associadas ao uso de anestésicos injetáveis são uma menor capacidade de ajuste do plano anestésico, visto que uma vez administrada a medicação, a dose não pode ser reduzida (11); aplicações sucessivas de anestésicos injetáveis usualmente estão associadas a um período de recuperação mais longo (4, 5).

Via intramuscular (IM)

Quando possível a via intramuscular deve ser evitada, pois a massa muscular de ratos e camundongos é pequena, e os mesmos são predispostos a desenvolver lesões nervosas e atrofia muscular após injeções (4,11). Os locais comumente utilizados para aplicação intramuscular são os músculos posteriores da coxa e a musculatura paravertebral. Agulhas de pequeno calibre 26 a 30G são recomendadas. Caso grandes volumes sejam necessários o volume deve ser dividido em vários locais. Substâncias irritantes devem ser diluídas em solução fisiológica 0,9% na proporção 1:1, ou até 1:10 (11).

Tabela 1 – Dose máxima a ser administrada em ratos de acordo com a massa corporal do rato e a via utilizada.

Via	Quantidade para cada 100 gramas de peso do animal
IP	2ml
SC	2ml
IM	0,3ml
IV	0,5ml
PO	2ml

Via intraperitoneal

A via de administração intraperitoneal é a mais comumente utilizada, devido a fácil execução, além de algumas substâncias serem irritativas pelas via intramuscular e subcutânea, e não intraperitonealmente. O anestésico dissociativo cetamina, por exemplo, pode causar necrose tecidual quando aplicada pela via intramuscular, mas é utilizado corriqueiramente pela via intraperitoneal sem complicações. As agulhas recomendadas são as de calibre 20-23G. Durante a aplicação é importante conferir que a agulha tenha o comprimento necessário para atravessar toda espessura da parede abdominal e penetrar, efetivamente, na cavidade (11).

Via intravenosa

A via intravenosa não é usualmente utilizada em pequenos roedores devido à dificuldade do acesso e ao número e tamanho limitado de veias periféricas. A veia de mais fácil acesso é a veia lateral da cauda. Devido à necessidade de contensão, essa via não deve ser utilizada para indução anestésica de animais, entretanto após a anestesia do animal, esse acesso pode ser realizado para administração de outras substâncias durante o procedimento (9).

Via inalatória

Entre as vantagens da anestesia inalatória estão maior controle do plano anestésico, o qual leva a menor mortalidade durante os procedimentos, mínimo metabolismo hepático e renal, menor biotransformação e excreção, quando comparada com anestésicos injetáveis (11, 14). Por estas características este tipo de anestesia é recomendado, principalmente, em experimentos toxicológicos (11). O despertar rápido e tranquilo reduz o tempo necessário de monitorização após o procedimento (4).

Existem dois métodos de anestesia inalatória para roedores. O primeiro é através do uso de algodão estéril embebido de anestésico dentro de uma câmara de inalação, neste método a quantidade precisa de anestésico oferecida ao animal não é conhecida e o plano anestésico do animal deve ser observado através da câmara de inalação (11). A outra opção é a utilização de uma câmara de indução conectada a um vaporizador calibrado ou universal, dessa maneira a quantidade de anestésico administrada é conhecida. Uma vez o animal anestesiado, o mesmo deve ser retirado da caixa e mantido anestesiado mediante o uso de máscara (11). A intubação é desaconselhada devido à dificuldade da realização da técnica em roedores, mas em caso estritamente necessário a técnica pode ser desenvolvida (4).

2. Analgesia

A analgesia deve ser administrada previamente a todo animal submetido a um procedimento potencialmente doloroso e também no período pós-operatório do mesmo. Segundo o item 6.3.2 da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, do CONCEA, pesquisadores e professores devem considerar que animais sentem dor de forma similar a humanos. Decisões relacionadas ao bem-estar dos animais devem ser baseadas nessa premissa. Pesquisadores, professores, alunos e técnicos devem prever, avaliar e tomar todas as medidas possíveis para evitar ou minimizar

a dor e o *distresse* dos animais durante o curso do projeto. A frequência dessa observação será determinada pelo grau de invasividade da manipulação, e deve ser realizada de tal forma que a dor e/ou *distresse* dos animais possam ser detectados precocemente. Cinco minutos de observação para cada animal, parece ser o tempo mínimo para a identificação de comportamentos dolorosos (1,10). Uma vez identificados sinais condizentes com dor e/ou desconforto o pesquisador deve agir imediatamente.

Animais com dor podem parecer irresponsivos, letárgicos, ansiosos, apreensivos, hipersensíveis ou agressivos (11). Outros sinais de dor em ratos são: redução da ingestão de água e alimento, piloereção (10), cifose vertebral, espasmos musculares, perda do equilíbrio enquanto está se lambendo, contração da musculatura abdominal quando a mesma encosta no chão da gaiola de alojamento, vacilar ou cair ao caminhar, caminhar agachado e prostração. O site <http://www.molecularpain.com/content/supplementary/1744-8069-7-55-s1.pdf> disponibiliza uma escala de reconhecimento facial para avaliação da dor que pode ser utilizada como subsidio para o reconhecimento da dor em ratos.

A dor pode causar alterações nos parâmetros fisiológicos e influenciar os resultados dos estudos, por isso deve ser evitada sempre que a mesma não for o alvo do estudo. Na Tabela 2 estão sumarizados os principais parâmetros fisiológicos dos ratos que devem obrigatoriamente ser conhecidos pelas pessoas que trabalham diretamente com a espécie. A analgesia preemptiva, ou seja, previamente a aplicação do estímulo doloroso é sempre benéfica (11), pois impede a sensibilização do corno dorsal da medula ao estímulo doloroso, tornando o controle da dor pós-operatória mais fácil e mais eficiente (5, 10,15). O processo doloroso não tratado aumenta a secreção de catecolaminas, provoca baixa de imunidade e estresse, os quais adicionam uma nova variável ao experimento (10, 11); o que, por sua vez, pode alterar os parâmetros fisiológicos e influenciar na coleta de dados. Por isso, o alívio da dor é de grande interesse tanto do animal quanto do pesquisador (7).

Tabela 2 – Parâmetros fisiológicos do rato.⁸

Parâmetro	Rato
Massa corporal (g)	300-520
Temperatura corporal (°C)	35,9-37,5
Frequência respiratória (mov.min ⁻¹)	70-115
Frequência cardíaca (bat.min ⁻¹)	250-450
Consumo alimentar	5-6g/100g de peso vivo/dia
Necessidade hídrica	10-12ml/100g de peso vivo/dia

Dois grupos principais de fármacos são utilizados para controle da dor de forma rotineira: opióides e anti-inflamatórios não esteroidais. Os anti-inflamatórios não esteroidais são efetivos para o tratamento da dor leve e moderada. Estes fármacos agem inibindo a produção enzimática de prostaglandinas, mediadores celulares liberados em resposta à lesão tecidual, e afetam os nociceptores. A metabolização desses fármacos é hepática e renal (7). Entre os efeitos adversos do uso estão: aumento do tempo de coagulação (10), úlceras e sangramentos duodenais e estomacais (13). Esses efeitos são mais comuns quando a medicação é utilizada por mais de três dias (7)

Opióides como a morfina, meperidina, butorfanol, buprenorfina, pentazocina, e fentanil agem se ligando aos receptores do córtex e da medula espinhal. Como efeitos adversos dos opióides podemos citar sonolência, redução da motilidade gastrointestinal, náusea, vômitos, a depressão respiratória que pode ocorrer em casos de superdosagem (1). Vale ressaltar que esses efeitos são raros em pacientes que estão em um processo doloroso. Para procedimentos marcadamente dolorosos é recomendada a associação de ambas as medicações.

Nas **Tabela 3** e **4** estão listados, respectivamente, os principais fármacos opióides e anti-inflamatórios não esteroidais utilizados em ratos, bem como a dosagem, a via e os intervalos de administração.

Tabela 3 – Dosagem de fármacos opióides para ratos.

Fármaco	Dose	Intervalo de administração
Buprenorfina ⁸	0,01-0,5mg/kg SC, IP ^{7, 15} 0,1-0,25mg/kg VO	6-8 horas de analgesia
Butorfanol ⁸	1-2mg/kg SC	4/4 horas
Codeína ⁸	25-60mg/kg SC	4 /4 horas
Fentanil ⁸	0,3mg/kg IP	Utilização transoperatória
Morfina ^{4,7}	2-10mg/kg SC	Até 3-4 horas de analgesia (3,14).
Meperidina ^{7,8}	20mg/kg SC,IM	Até 3-4horas de analgesia (14)
Metadona ¹⁵	0,5-3mg/kg SC	Intervalo não estabelecido. Reaplicar conforme a necessidade do animal.
Oximorfona ⁸	0,2-0,5mg/kg/ SC IM	6-12 horas de analgesia
Tramadol	5mg/kg SC/IP	12/12 horas

Tabela 4 – Dosagem de fármacos anti-inflamatórios, comumente, utilizadas em ratos.

Fármaco	Dose	Intervalo de administração
Aspirina ⁵	100mg/kg VO	24/24h . Dificil administração, não alivia dor visceral ou dor aguda. ⁷
Cetoprofeno	5mg/kg SC ^{6, 15} 10-20mg/kg IP	12-24 horas de analgesia; Período máximo de uso 3 dias.
Carprofeno ^{5,7,8}	5mg/kg SC/VO	12-24 horas de analgesia Período Maximo de uso 4 dias.
Celecoxib ¹⁵	10-20mg/kg VO	12-24 horas.
Codeína	25-60mg/kg SC	4 /4 horas
Diclofenaco sódico ⁸	10mg/kg VO	Dose única. Intervalo de uso não estabelecido.

Dipirona ¹⁵	50-600mg/kg SC/IV/IP	12/12h
Flunixin meglumine ⁸	2,5kg SC/IM	12/12h ou 24/24h
Ibuprofeno ^{5,8}	10-30mg/kg VO	4/4h
Meloxicam ^{8,9,15}	1mg/kg SC/IP/VO	Período máximo de uso 3 dias.
Paracetamol	50mg/kg SC/IP 100mg/kg IP 300mg/kg/VO ⁴	4/4h
Piroxicam ⁸	3mg/kg/VO	Dose única. Intervalo de uso não estabelecido.

3. Procedimento Anestésico

O procedimento anestésico deve iniciar com a administração de um sedativo ou tranqüilizante ao animal (Tabela 5) como medicação pré-anestésica e a manutenção do mesmo em seu ambiente conhecido até que ele faça efeito. Dessa maneira o estresse decorrente do deslocamento para área de preparação ou sala cirúrgica será menor.

O plano anestésico deve ser ajustado conforme o procedimento a ser realizado. A Tabela 6 mostra algumas opções de protocolos anestésicos.

Idealmente todo protocolo anestésico deve incluir, além do anestésico, um analgésico opióide, uma vez que os anestésicos apenas deprimem o sistema nervoso, mas não bloqueiam o estímulo doloroso (14). Sempre que possível a anestesia local deve ser incluída para reduzir a necessidade de anestésico geral, melhorar a analgesia e reduzir a chance de óbito durante o procedimento anestésico (14). A analgesia multimodal é ideal, pois reduz a chance de efeitos deletérios e tem atividade sinérgica (10). Todos os animais devem receber analgesia pós-operatória, em caso de dúvida, assume-se que o que causa dor e *distresse* em humanos, também gera o mesmo tipo de sofrimento nos animais (13). A anestesia dissociativa não inibe a dor visceral, e oferece pouco relaxamento muscular (11),

por isso é recomendada para contenção química e procedimento de pequeno porte (coleta de sangue, exame radiográfico).

Agentes bloqueadores neuromusculares (pancurônio, vencurônio, atracúrio) somente podem ser utilizados em conjunto com a anestesia geral ou em procedimento cirúrgico que elimine a percepção sensorial. O uso de agentes bloqueadores neuromusculares deve ser orientado por profissional habilitado, pois esses agentes paralisam os músculos respiratórios sendo indispensável a intubação e a respiração assistida (7). A imobilização de um animal apenas com agente bloqueador neuromuscular não é aceitável, pois o mesmo não possui efeito sedativo ou analgésico (7). O uso de agentes bloqueadores neuromusculares não permite que critérios de monitoramento, como o padrão respiratório, reflexo flexor e corneal, possam ser utilizados. O monitoramento contínuo ou frequente dos batimentos cardíacos, pressão arterial e tamanho de pupila são necessários.

Tabela 5 – Dosagem de medicações pré-anestésicas para ratos.

Fármaco	Dosagem
Acepromazina ²	2,5mg/kg IM, IP
Diazepam ²	2,5-5mg/kg /IP
Midazolam ²	5mg/kg IP
Medetomidina ^{2*}	30-100µg/kg SC , IP
Ketamina ^{2, 15*}	50-100 mg/kg IP – Pode causar aumento da pressão sanguínea.
Xilazina ²	1-5mg/kg IP/IM

Tabela 6 - Dosagem de fármacos anestésicos utilizados em ratos.

Fármaco	Dosagem	Tempo de Duração	Indicação /Comentários
Isoflurano Halotano Enflurano*	3-4% indução 1-2% manutenção ⁷	Recuperação rápida após o término do fornecimento.	Ideal para experimentos toxicológicos, devido à baixa metabolização hepática e renal ¹¹ .
Isoflurano + morfina ¹⁵	Isoflurano a 2% Inalação Morfina 5mg/kg IP	Recuperação rápida após o término do fornecimento.	
Ketamina + Xilazina ^{13,7*}	60-90mg/kg (K) + 5-10mg/kg (X) IP	30-45 minutos duração. Suplementação com 1/3 da dose de Ketamina.	Essa associação gera hiperglicemia, decorrente do aumento da produção hepática e redução dos níveis de insulina. Aumento da Pressão intraocular; Redução da motilidade gastrointestinal; Bom relaxamento muscular bom plano anestésico. ¹¹
Ketamina + Diazepan ^{4*}	75mg/kg (K) + 5mg/kg (D) IP	20-30 minutos de anestesia leve.	Associação recomendada para estudos recomendados que precisem mínima depressão respiratória e cardiovascular. Hiperacusia pode ocorrer em baixa dose.
Ketamina + Midazolam ^{4*}	75mg/kg (K) + 5mg/kg (M) IP	20-30 minutos de anestesia leve.	
Ketamina + Xilazina+ Acepromazina*	40mg/kg (K) + 8mg/kg (X) + 4mg/kg (A) IP	25 minutos de anestesia.	
Ketamina + propofol	40mg/kg (K) + 60mg/kg (P) IP	32 minutos de anestesia cirúrgica	
Midazolam + Xilazina + Ketamina	3mg/kg (M) +3mg/kg(X) + 75mg/kg (K)	35-40 de anestesia cirúrgica	
Pentobarbital*	20-40mg/kg IV 40-60/kg IP	45 minutos de anestesia cirúrgica.	Potente indutor do sistema enzimático microsossomal hepático. Não é encontrado mais no Brasil ¹⁴ .
Propofol*	10mg/kg ^{4,15} 100mg/kg IP	A aplicação IP pode gerar 27 minutos de anestesia cirúrgica.	
Thiopental*	20-40mg/kg IV 40mg/kg IP	5-10 minutos de anestesia	
Tiletamina + Zolazepam ^{8*}	20-40mg/kg IP ⁵	Está associada a um tempo de recuperação prolongado, hipotermia severa e hiperacusia.	Observar que a dose é referente à mistura vendida. Não é recomendada para anestesia cirúrgica apenas para pequenos procedimentos como coleta de sangue e contensão química. ¹⁴

*Idealmente adicionar um opióide a esse protocolo ou medicação.

4. Guia de Severidades dos Procedimentos Científicos

Segue abaixo (**Tabela 7**) sugestões de protocolos analgésicos a serem implementados conforme a natureza do estímulo doloroso:

Tabela 7- Exemplos de procedimentos realizados em ratos, classificação conforme o estímulo doloroso causado e sugestão de protocolo analgésico a ser implementado associado à anestesia geral. Em caso de dúvida fazer analogia a escala de dor humana (5).

Dor leve a moderada¹³	Dor Moderada¹³	Dor moderada a severa¹³
<ul style="list-style-type: none"> * Colocação de cateter vascular * Colocação de brinco * Implantação superficial de tumor * Procedimentos Oculares * Injeções múltiplas 	<ul style="list-style-type: none"> * Laparotomia * Tireoidectomia * Cesariana * Transferencia de embrião * Hipofisectomia * Timectomia * Acesso à veia porta * Colocação de bomba osmótica * Colocação de implante intracerebral Modelos com indução de tumores 	<ul style="list-style-type: none"> * Laparotomia exploratória * Toracotomia * Transplante de Órgãos * Procedimentos na coluna Vertebral * Procedimentos de Queimadura * Modelos de trauma * Procedimentos Ortopédicos * Ligação do ceco e punção * Modelos com indução de tumores invasivos. *Transplante de órgão com rejeição.
Anestesia local associada à carprofeno/meloxicam ou a buprenorfina ¹³	Anestesia local associada à carprofeno/ meloxicam ou a buprenorfina ¹³	Anestesia local associada à carprofeno/meloxicam e a morfina/ buprenorfina ¹³ . A analgesia é necessária por no mínimo três dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. CARBONE, L. Pain in Laboratory Animals: The Ethical and Regulatory Imperatives. *Plos One*, v. 6, n. 9, p.1-6, 2011.
2. DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS – DBCA. Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226494.pdf Acesso em 17 de Setembro de 2013.
3. DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA. Disponível em http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226746.pdf. acessado em 10.09.2013. Acesso em 17 de Setembro de 2013.
4. FLECKNELL, P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 3ed. 2009. 300p.
5. Guidelines for Rodent Analgesia. Disponível em: <http://vetmed.duhs.duke.edu/GuidelinesforRodentAnalgesia.html>. Acesso em 17 de Setembro de 2013.
6. Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits. Disponível em: http://www.aclam.org/Content/files/files/Public/Active/position_pain-rodent-rabbit.pdf Acesso em 17 de Setembro de 2013.
7. GUIDELINES ON ANESTHESIA AND ANALGESIA IN LABORATORY ANIMALS. Disponível em: <http://www.southalabama.edu/researchcompliance/pdf/anesthanalgesia.pdf> Acesso em: 17/09/2013.
8. HRAPKIEWICZ, K. & MEDINA, L. Rats. In: _____ *Clinical Laboratory Animal Medicine an introduction*. 3ed., 2007. Cap. 5, p. 79-111.
9. *Laboratory Animals: Rodent Anesthesia & Analgesia*. Disponível em: <http://ehs.uc.edu/lams/data/pdfs/9054.pdf>. Acesso em 17/09/2013.
10. Lee-Parriz, D. ANALGESIA FOR RODENT EXPERIMENTAL SURGERY. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, v. 62, n.3-4, 2007 Disponível em: http://www.isrvma.org/ImageToArticle/Files/Vol%2062_3-4%20ANALGESIA%20FOR%20RODENT%20EXPERIMENTAL%20SURGERY.doc. Acesso em 17 de Setembro de 2013.
11. MURRAY, K.A.; PEKOW, C., BORKOWSKI, G.L. *Laboratory Animals: Rodent Anesthesia & analgesia*. In: *Laboratory Animal Medicine and Science – Series II., Health Sciences for Educational Resources* University of Washington, 2000.
12. PORTARIA Nº 465, DE 23 DE MAIO DE 2013. Disponível em <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/310553.html>. Acesso em 03 de Setembro de 2013.
13. Post-Operative Analgesia for Rodents. Disponível em: http://www.research.fsu.edu/acuc/Policies_Guidelines/Guidelines-Post%20Operative%20Analgesia%20Rodents.pdf. Acesso em 17 de Setembro de 2013.
14. Rodent anesthesia and analgesia. Disponível em: http://www.animalcare.ubc.ca/anestheshia_analgesia.html. Acesso em 19 de setembro de 2013.
15. RODENT_ANESTHESIA_AND_ANALGESIA_FORMULARY.pdf. Disponível em: <http://www.upenn.edu/regulatoryaffairs/Documents/Guideline>. Acesso em 17 de Setembro de 2013.