

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA EM ANIMAIS DE
LABORATÓRIO**

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Monica Souza Ferreira Pinto

**ANÁLISE COMPARATIVA DE DOIS MÉTODOS DE EUTANÁSIA
POR OVERDOSE DE ANESTÉSICO INALATÓRIO EM NEONATOS
DE CAMUNDONGOS *SWISS WEBSTER*.**

Rio de Janeiro - RJ

2020

Monica Souza Ferreira Pinto

**ANÁLISE COMPARATIVA DE DOIS MÉTODOS DE EUTANÁSIA
POR OVERDOSE DE ANESTÉSICO INALATÓRIO EM NEONATOS
DE CAMUNDONGOS *SWISS WEBSTER*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - Fiocruz/RJ, como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciência em Animais de Laboratório

Orientadora: Dra. Klena Sarges Marruaz da Silva

Coorientadora: Dra. Gladys Corrêa

Rio de Janeiro

2020

Pinto, Monica Souza Ferreira.

ANÁLISE COMPARATIVA DE DOIS MÉTODOS DE EUTANÁSIA POR OVERDOSE DE ANESTÉSICO INALATÓRIO EM NEONATOS DE CAMUNDONGOS *SWISS WEBSTER*. / Monica Souza Ferreira Pinto. - Rio de janeiro, 2020.

83 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2020.

Orientadora: Klena Sarges Marruaz da Silva.

Co-orientadora: Gladys Corrêa.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Eutanásia. 2. Isoflurano. 3. Camundongos. 4. Neonatos. 5. Ciência em Animais de Laboratório. I. Título.

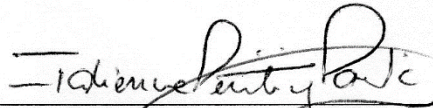
Monica Souza Ferreira Pinto

**ANÁLISE COMPARATIVA DE DOIS MÉTODOS DE EUTANÁSIA
POR OVERDOSE DE ANESTÉSICO INALATÓRIO EM NEONATOS
DE CAMUNDONGOS *SWISS WEBSTER*.**

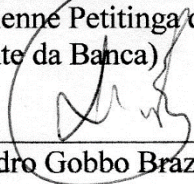
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - Fiocruz/RJ, como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciência em Animais de Laboratório

Aprovada em 05 de Junho de 2020.

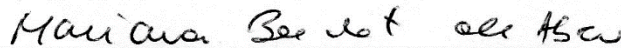
Banca Examinadora:



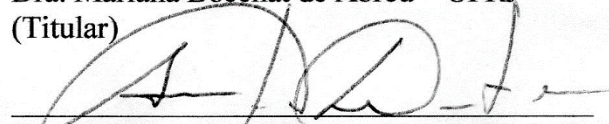
Dra. Fabienne Petitinga de Paiva – ICTB-FIOCRUZ
(Presidente da Banca)



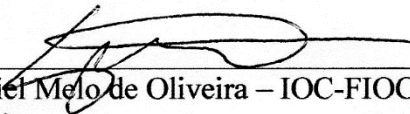
Dr. Leandro Gobbo Braz - UNESP
(Titular)



Dra. Mariana Boechat de Abreu – UFRJ
(Titular)



Dr. Ary Elias Aboud Dutra – Universidade Castelo Branco
(Suplente)



Dr. Gabriel Melo de Oliveira – IOC-FIOCRUZ
(Suplente)

Rio de Janeiro

2020

Dedicatória

Dedico este trabalho aos animais que aceitaram a missão de colaborar com o crescimento da humanidade, a todas as entidades que me mantiveram firmes nessa trajetória e ao meu filho, que me compreendeu e apoiou desde o início.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de estar encarnada neste planeta.

À minha mãe que sempre está ao meu lado em qualquer situação.

Ao meu filho, razão da minha vida ontem, hoje e sempre.

Aos animais que merecem todo meu amor e respeito.

À minha orientadora Kléna Sarges Marruaz da Silva que não mediu esforços para me apoiar nesse projeto, viabilizando todo esse sonho. Além de tudo isso, tenho a certeza de que ganhei uma amiga para a vida.

À minha coorientadora Gladys Corrêa que sempre esteve ao meu lado me incentivando, e porque não dizer que encontrei uma irmã que irá me acompanhar por toda vida.

Aos membros da banca Dra. Fabienne Petitinga de Paiva, Dr. Leandro Gobbo Braz, Dra. Mariana Boechat de Abreu, Dr. Ary Elias Aboud Dutra e Dr. Gabriel Melo de Oliveira; pela presença e colaboração com este projeto.

À Dra. Mariana Gobbo Braz que nos recebeu de forma acolhedora na UNESP/ Botucatu sendo extremamente solícita ao projeto.

À Direção do ICTB pelo suporte financeiro a este projeto por meio do Edital de Chamada de Trabalhos ICTB 01/2018, à Vice Direção de Ensino e Pesquisa e à Coordenação do Núcleo de projetos Estratégicos do ICTB por todo apoio durante a execução deste trabalho.

À minha chefe no SCRL Isabel Maria Freire, que compreendeu todo o esforço.

À toda equipe do SCRL/ICTB, por colaborarem com este projeto, em especial à Ana Paula Rodrigues, que é responsável pela colônia de fêmeas grávidas de *Swiss Webster*.

À toda equipe do mestrado e do ensino deste instituto, meu muito obrigada.

Aos meus amados colegas de turma, que tornaram tudo mais leve, Hugo Leonardo Dias, André Matos, Valéria Borghesi, Fábio Rodrigues, Mika Aihara, Ana Karina Furtado, Gabriel Moraes, Viviane Ferreira.

Aos meus amigos que fingiram entender a minha ausência nesse período.

E por último, mas não menos importante, agradeço a minha família espiritual (CUpBA) por todo apoio, não me deixando fraquejar em nenhum momento.

Epígrafe

“Não há vida que não mereça ser protegida, mesmo as menores das criaturas no reino do Pai precisam de anjos para lhes guardar a alma. São tantos anjos, alguns falsos, outros verdadeiros, mas os melhores nem sabem que são.”

pai Benedito de Angola.

RESUMO

A eutanásia na Ciência em Animais de laboratório é um tema delicado e que vem sendo discutido de forma mais intensa nos últimos anos, uma vez que envolve questões éticas e de bem-estar animal. Os métodos de eutanásia aceitáveis devem proporcionar uma eutanásia rápida, indolor e não estressante. No Brasil, é indicado o uso de anestésicos gerais injetáveis ou inalatórios para pequenos roedores. No caso de camundongos neonatos, a decapitação e o congelamento rápido são práticas correntes nas criações e experimentações pelo Brasil, mesmo sendo métodos aceitos com restrição pelo CONCEA. Neste estudo foram comparados dois métodos de administração de isoflurano para eutanásia de neonatos: uso de gaze embebida em isoflurano (volatilização espontânea) e insuflação de altas doses de isoflurano por vaporizador universal (volatilização forçada pelo oxigênio), ambos em câmara de eutanásia. A eficiência dos métodos foi comparada por meio da análise dos tempos: até a inconsciência pela avaliação de LORR (*loss of the righting reflex*), da perda de reflexos pela avaliação de LOPR (*loss of the pedal withdrawal reflex*) e parada cardíaca avaliada por meio de *doppler* vascular. Além destas aferições, foram mensurados os resíduos gerais de anestésicos (RGA) no ambiente, com resultados que poderão contribuir para avaliações sobre a saúde ocupacional do operador. Os resultados demonstraram que ambos os métodos levam à inconsciência (LORR) em tempos médios similares, entretanto o uso de gaze embebida com isoflurano, em câmara de eutanásia, ocasiona um tempo menor para perda de reflexo de dor profunda e tolerância cirúrgica (LOPR) e um tempo menor até a parada cardíaca, além de gerar menor custo e produzir menor contaminação do ambiente de eutanásia.

Palavras-chave: Eutanásia. Isoflurano. Camundongos; Neonatos; Ciência em Animais de Laboratório.

ABSTRACT

Euthanasia in Laboratory Animal Science is a sensitive topic and has been discussed more intensively in recent years since it involves ethical and animal welfare issues. Acceptable euthanasia methods should provide quick, painless and non-stressful euthanasia. In Brazil, the use of general injectable or inhaled anesthetics is recommended for small rodents. In the case of neonatal mice, decapitation and rapid freezing are common practices in breeding and experimentation in Brazil, even though methods are restricted by Conceia. In this study, two methods of administering isoflurane for euthanasia of neonates were compared: use of gauze soaked in isoflurane (spontaneous volatilization) and insufflation of high doses of isoflurane by universal vaporizer (volatilization forced by oxygen), both in a euthanasia chamber. The efficiency of the methods was compared through the analysis of times: up to unconsciousness by the LORR (loss of the righting reflex) assessment, the loss of reflexes by the LOPR (loss of the pedal withdrawal reflex) assessment and cardiac arrest assessed by means of vascular *doppler*. In addition to these measurements, general anesthetic residues (RGA) in the environment were measured, with results that may contribute to evaluations of the operator's occupational health. The results showed that both methods lead to unconsciousness (LORR) in similar average times, however the use of gauze soaked with isoflurane, in a euthanasia chamber, causes a shorter time for loss of reflex of deep pain and surgical tolerance (LOPR) and shorter time to cardiac arrest, in addition to lower costs and less contamination of the euthanasia environment.

Keywords: Euthanasia. Isoflurane. Mice. Neonates. Laboratory Animal Science.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACVA- Colégio Americano de Anestesiologistas Veterinários
- AnGm- Animal Geneticamente Modificado
- AVMA- *American Veterinary Medical Association*
- CAM- Concentração Alveolar Mínima
- CAL- Ciência em Animais de Laboratório
- CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais
- CFMV- Conselho Federal de Medicina Veterinária
- Concea - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CO₂- Dióxido de Carbono
- COV- Compostos Orgânicos Voláteis
- °C- Graus Celsius
- DNA- Ácido desoxirribonucléico
- ECG- Eletrocardiograma
- EEG- Eletroencefalograma
- Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz
- FT- Fluxo Total de Gás Fresco (mL/min)
- FV- Fluxo de Gás Fresco através da Câmara de Vaporização (mL/min)
- IACUC- *Institutional Animal Care and Use Comité*
- IASP- *Association for the Study of pain*
- ICTB- Instituto em Ciência e Tecnologia em Biomodelos
- ILAR- *Institute for Laboratory Animal Research*
- JCAHO- *Join Commission Accreditation of Healthcare Organization*
- LASA- *Laboratory Animal Science Association*
- LOPR- *Loss of the Pedal withdrawal Reflex*
- LORR- *Loss of the Righting Reflex*
- MCTIC- Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação.
- min- Minutos
- mL- Mililitros

mmHg- Milímetros de Mercúrio

NC3Rs- *National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research*

NIOSH- *Institute of Occupational Safety and Health*

Pa- pressão atmosférica

PA 50- Pressão Parcial em que 50% dos Pacientes Perdem a Nocicepção

POP- Procedimento Operacional Padrão

PV- Pressão de Vapor a 20°C

RGA- Resíduos Gerais de Anestésicos

SNC- Sistema Nervoso Central

RN- Resolução Normativa

RNPT- Recém-Nascido Prematuro

SCRL- Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos

SED- Síndrome do Edifício Doente

SO- Sala de Operação

TTD- *Time to Death*

UFAW's- *Universities Federation for Animal Welfare*

UNESP- Universidade Estadual Paulista

UNIPEX- Unidade de Pesquisa Experimental

UTIN- Unidade de Terapia Intensiva

UV- Ultravioleta

V/V%- Volume/Volume percentual

3R's- *Refinement, Replacement, Reduction*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Neonato de camundongo Swiss Webster de 7 dias	47
Figura 2- Imagem do desenho experimental do estudo realizado no software livre EDA®.....	48
Figura 3- Câmara de eutanásia confeccionada para o experimento e respectivas aberturas.....	49
Figura 4-Método de eutanásia utilizado para o Grupo Gaze	50
Figura 5 - Método de eutanásia utilizado para o Grupo Aparelho.....	51
Figura 6 - Aparelho de anestesia inalatória digital Bonther® utilizado no experimento para o Grupo Aparelho.....	52
Figura 7 - Avaliação de LORR em neonato de camundongo	52
Figura 8 - Avaliação de LOPR em neonato de camundongo.....	53
Figura 9 - Avaliação com doppler vascular até parada cardíaca.....	54
Figura 10 - Monitor de agentes anestésicos <i>Vamos Plus</i>® (<i>Wilks Enterprises – EUA</i>) .	54
Figura 11 - Pontos de mensuração da concentração de isoflurano (%) dentro da câmara de eutanásia com o <i>Vamos Plus</i>®	55
Figura 12 - Analisador de gases ambientais <i>InfraRan 2</i>® (<i>Dräger - Alemanha</i>)	56
Figura 13 - Ponto de mensuração da concentração de isoflurano (ppm) fora da câmara de eutanásia com o <i>InfraRan 2</i>®, próximo ao operador	56
Figura 14 - Gráfico demonstrativo de exposição do operador ao isoflurano (ppm) avaliado pelo <i>InfraRan 2</i>® nos dois métodos (Grupo Gaze e Grupo Aparelho) utilizados no experimento.	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Métodos de eutanásia estabelecidos pela RN 37/Concea 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantidade de isoflurano líquido necessário para produzir concentrações percentuais em câmaras com volume conhecido	36
Tabela 2 - Volumes de isoflurano necessários para gerar índices (%) desejados em caixas de volume conhecido	37
Tabela 3- Índice de relação de vaporizador de Bypass variável	38
Tabela 4- Valores de parâmetros observados, consumo e custos com isoflurano no Grupo Gaze/animal.	58
Tabela 5- Valores de parâmetros observados, consumo e custos com isoflurano no Grupo Aparelho/animal.	60
Tabela 6- - Dados comparativos entre os grupos gaze e aparelho para avaliações de LORR, LOPR e parada cardíaca.....	61
Tabela 7- Dados comparativos entre os grupos gaze e aparelho para volume (mL) de isoflurano gasto e custo (R\$) de isoflurano por neonato.....	62
Tabela 8- Concentração de isoflurano (%) no interior da câmara para o Grupo Gaze obtida pelo Vamos Plus®	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	JUSTIFICATIVA	16
3	OBJETIVO	17
3.1	Objetivo Geral	17
3.2	Objetivos específicos	17
4	REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1	O uso de animais de laboratório e a experimentação animal	18
4.1.1	A experimentação em camundongos (<i>Mus musculus</i>)	20
4.1.2	Legislação na experimentação animal	20
4.2	Bem-estar e o princípio dos 3Rs	22
4.3	Eutanásia e Legislação Aplicada	24
4.3.1	Métodos de eutanásia para roedores	27
4.4	Anestesia e Agentes Inalatórios	33
4.5	Dor, Distresse, Estresse e Constatação do óbito em neonatos	41
4.6	Contaminação ambiental por anestésicos voláteis e exposição ocupacional	45
5	MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1	Animais, condições de alojamento, manejo e licença	47
5.2	Desenho Experimental	48
5.3	Métodos de eutanásia e parâmetros aferidos	48
5.4	Análise de gases voláteis no ambiente e na câmara de eutanásia	54
5.5	Análise estatística	57
6	RESULTADOS	58
6.1	Resultados dos parâmetros aferidos e custos dos métodos	58
6.2	Resultados das concentrações de isoflurano obtidas no interior e exterior da câmara de eutanásia	62
6.3	POP	64
7	DISCUSSÃO	65
8	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE 1	81

1 INTRODUÇÃO

A eutanásia na Ciência em Animais de laboratório é um tema bastante delicado, tendo em vista questões éticas e de bem-estar animal envolvidos. Cabe ao médico veterinário estudar formas e métodos de aplicabilidade e confiança incontestáveis, seguindo os preceitos da legislação vigente. Nos centros de criação de animais de laboratório, como o SCRL (Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos) do ICTB (Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos)/Fiocruz (Fundação Instituto Oswaldo Cruz), são enviados animais de várias faixas etárias para o descarte zootécnico, o qual é feito através da eutanásia. O descarte zootécnico no biotério de criação são todos os animais excedentes da produção que foram produzidos, porém não atenderam a todos os pré-requisitos dos pesquisadores que os solicitaram (p.ex., peso, idade, sexo.); animais com baixa nos índices reprodutivos e mais velhos. No caso de camundongos neonatos, a decapitação e o congelamento rápido são as práticas de eutanásia correntes nas criações e experimentações pelo Brasil, os quais são métodos físicos aceitos com restrição pelo Concea (Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal) (BRASIL, 2018). Estes métodos, são bastante difundidos pelo fato de neonatos serem resistentes à hipóxia; mecanismos ainda remanescentes da vida intra-útero; o que gera insegurança em submetê-los a métodos de eutanásia por agentes voláteis que causem hipóxia somente. Ainda há o pensamento que, devido a imaturidade do sistema nervoso estes são “insensíveis” à dor, o que não é verdade, pode-se afirmar que os recém-nascidos não só sentem dor, como tem maior sensibilidade, sentindo-a por mais tempo (ALMEIDA, 2005; SANTOS, RIBEIRO, SANTANA, 2012; MARTIN, 2017). Quando são citados os métodos de eutanásia aceitáveis, as indicações são de que a eutanásia seja rápida, indolor e não estressante. Basicamente, é indicado o uso de anestésicos gerais injetáveis ou inalatórios. Os anestésicos inalatórios trazem vantagens quanto à pouca manipulação do animal, facilidade de administração e inconsciência rápida (BRASIL, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Os roedores mantidos em instalações animais são submetidos à eutanásia tanto quando há necessidade de descarte zootécnico da produção em biotérios de criação quanto ao final do experimento em biotérios de experimentação. A Resolução Normativa (RN) nº 37 do Concea indica os métodos de eutanásia para cada espécie animal utilizada em atividades de pesquisa e ensino. Para camundongos, o método recomendável de eutanásia é o uso de anestésicos gerais. Como métodos aceitáveis com restrição são citados: utilização de CO₂, deslocamento cervical, micro-ondas, congelamento rápido em nitrogênio líquido e a decapitação, estas duas últimas técnicas permitidas somente para animais de até sete dias de vida (neonatos). A RN também recomenda que "neonatos devem ser submetidos aos mesmos métodos de eutanásia que os congêneres adultos da mesma espécie", apenas utilizando-se de anestésicos gerais. A Resolução Nº 1000 do CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária) corrobora as informações da RN 37 do Concea. O projeto optou por utilizar neonatos de sete dias de vida por ser a idade limite para a decapitação permitida na legislação atual. Considerando que devemos adotar as premissas dos 3Rs (redução, refinamento e substituição) como compromisso ético na utilização de biomodelos e que os métodos de eutanásia devem proporcionar ausência ou redução máxima de dor, estresse e distresse, inconsciência rápida, garantindo o bem-estar animal. Este trabalho pretendeu avaliar o bem-estar em neonatos submetidos à eutanásia utilizando-se dois métodos de administração de isoflurano (volatilização espontânea do anestésico em chumaço de gaze e utilização de vaporizador universal em aparelho de anestesia), analisar os tempos levados até a inconsciência (LORR), até a perda de reflexo de dor profunda e tolerância cirúrgica (LOPR) e parada cardíaca avaliada através de *doppler* vascular. O trabalho poderá ainda contribuir com a proposição de adendos ou modificações nas Resoluções Normativas, acrescentando métodos mais éticos de eutanásia para neonatos e refinamento do POP (Procedimento Operacional Padrão) de eutanásia do SCRL/ICTB/Fiocruz.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Comparar a eficiência de dois métodos de administração de isoflurano na eutanásia de camundongos neonatos *Swiss Webster*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os tempos em cada um dos métodos utilizados para inconsciência (LORR); perda do reflexo de dor profunda (LOPR) e parada cardíaca;
- Avaliar o custo-benefício em cada método;
- Avaliar a contaminação por isoflurano do ambiente de eutanásia em cada método.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O uso de animais de laboratório e a experimentação animal

Há séculos o ser humano busca o conhecimento científico para beneficiar tanto sua saúde como a saúde dos animais. Após séculos de utilização dos animais em experimentação, surgiu a necessidade da realização de estudos voltados ao refinamento dos biomodelos, bem como seus métodos de criação, surge então a Ciência em Animais de Laboratórios (CAL). A CAL engloba várias áreas de estudo como a genética, a sanidade, o manejo, o bem-estar e a educação. A genética tem papel importantíssimo, pois está diretamente ligada a uma produção cada vez maior de Animais Geneticamente Modificados (AnGM). Atualmente, existem mais de 10 mil linhagens de camundongos. Este fato é tão importante que, em 2007, o Prêmio Nobel de Medicina foi concedido para os autores que desenvolveram a técnica de alteração no genoma murino. Novas tecnologias em instalações e alojamentos, como barreiras sanitárias, estantes ventiladas e caixas com ventilação individual são modificações que foram desenvolvidas com o objetivo de melhorar o manejo e a criação dos animais. É importante salientar que o bem-estar animal foi considerado primordial para o desenvolvimento dessas inovações (FLAJBAT; AMARAL; RIVERA, 2008).

Hipócrates e Aristóteles obtiveram seus conhecimentos sobre o corpo humano através da dissecação de animais, esses conhecimentos foram relatados, respectivamente, nas obras “*História Animalium*” e “*Corpus Hippocraticum*” (REGIS; CORNELLI, 2012). Já em 1540, na sua obra “*De Humani Corporis Fabrica*”, Vesalius delineou os mecanismos que regem o corpo humano e, em 1628, William Harvey, por sua vez, demonstrou o funcionamento da circulação sanguínea. Ambos utilizaram modelos animais para seus estudos (GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016). No século XVII a experimentação animal atingiu seu auge (REGIS; CORNELLI, 2012), tendo como pano de fundo a Revolução Industrial, onde ocorreu o desenvolvimento das cidades, com o provável aumento das doenças transmissíveis. François Magendie (1873-1855) e seu sucessor Claude Bernard (1818-1878) foram em busca das bases fisiopatológicas das doenças através do uso de animais (LIMA, 2008).

René Descartes associou sensibilidade e alma. Como para ele os animais não possuíam alma, conseqüentemente, não seriam capazes de sentir dor. Este pensamento corroborou e legitimou a utilização de animais na pesquisa científica fazendo com que estes fossem vistos como máquinas, o que deu origem à teoria “mecanicista”. Em 1789, contrapondo-se a Descartes, o filósofo e jurista Jeremy Bentham lança as bases para os

princípios morais e a legislação atualmente utilizada nas regulamentações éticas dos procedimentos de experimentação animal. Este argumentava que a capacidade de sofrer e não a capacidade de raciocinar é que deve ser levada em consideração como forma de tratamento de outros seres. Esse pensamento foi propagado no século XIX com o crescimento da experimentação animal, época de surgimento das primeiras entidades protetoras dos animais, estendendo-se até os dias atuais (GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016).

Em 1873 houve a publicação do livro intitulado “*Handbook for the Physiological Laboratory*” (Manual para Laboratório de Fisiologia), onde pela primeira vez foi relatado um texto sobre fisiologia claro e abrangente sobre o tema. Por conta desta publicação, Burdon-Sanderson e Klein, autores do *Handbook*, sofreram grande crítica pelos movimentos antivivisseccionistas, já que eles foram responsáveis pela maioria dos experimentos dolorosos. Em torno de 15% dos experimentos do *handbook* não faziam nenhuma menção ao uso de anestesia, apesar do éter e do clorofórmio já estarem em uso desde a década de 1840 (ATALAC; FATOVIC-FERENCIC, 2009).

Peter Singer, em 1973, veio contrariar a lógica “Especista”, que falava que seria possível usar uma vida não humana na experimentação em benefício de uma vida humana. Ele dizia que “o sofrimento de cada espécie deve ser refletido e comparado ao sentido por membro de outra espécie”. Ele queria estender aos animais os grandes princípios de liberdade, igualdade e fraternidade, no que ele conceituou como “libertação animal”. Foi levantada também a questão relacionada à *senciência*, palavra que vem do latim *sentire* e que significa sentir, “capacidade de sofrer” ou sentir prazer ou felicidade (GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016; SINGER, 1974).

A experimentação animal se reveste de uma importância incalculável nas pesquisas científicas, contribuindo sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Sua vasta contribuição nos diferentes campos científicos vem promovendo ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de inúmeras enfermidades que acometem os seres vivos. Como exemplos de contribuições científicas advindas de estudos realizados em animais tem-se a descoberta da insulina, o desenvolvimento de vacinas contra diversas doenças e a produção de soros. Os animais foram responsáveis por descobertas que permitiram o uso terapêutico de antibióticos, o tratamento de diversas doenças, evitando assim epidemias e epizootias, bem como o desenvolvimento de técnicas de transplantes de

órgãos e a possibilidade do uso de fármacos anestésicos, antidepressivos, entre outros (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

4.1.1 A experimentação em camundongos (*Mus musculus*)

Ao longo de 200 anos de desenvolvimento científico várias espécies animais vêm sendo utilizadas, mas dentre todas essas, os camundongos são os mais utilizados e os mais profundamente conhecidos cientificamente. Os camundongos atualmente utilizados têm ancestralidade relacionada aos camundongos sinantrópicos, que acompanham o homem há muito tempo, dividindo a casa, a alimentação e as doenças. Existem registros dessa convivência há mais 4 mil anos, mas somente no século XIX os camundongos se tornaram parte dos laboratórios de pesquisa. Sua introdução como animal de laboratório deve-se principalmente ao fato de ser pequeno, muito prolífero, ter período de gestação curto, ser de fácil domesticação e manutenção. O camundongo é membro da classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus*. Essa classificação é a mais aceita; todavia, há controvérsias sobre espécies e subespécies criadas em laboratórios devido à presença de cruzamentos especiais, nos quais os animais apresentam alguns genes ou, até mesmo, cromossomos de espécies diferentes. Como exemplo, tem-se a linhagem C57BL/6, na qual 6,5% do genoma é originário de *Mus spretus* e não de *Mus musculus*. O camundongo muitas das vezes é visto como um “tubo de ensaio”, mas deve ser tratado como organismo vivo complexo utilizado na experimentação. Os camundongos possuem 20 pares de cromossomos e muitos mutantes com centenas de colônias geneticamente definidas. Essas colônias são obtidas através de sistemas de acasalamentos especiais, sendo que os mais utilizados são: endocruzamentos – acasalamentos entre indivíduos que possuem ancestrais comuns produzindo as linhagens “*inbred*” e os heterocruzamentos - acasalamentos ao acaso evitando-se a consanguinidade produzindo-se as linhagens “*outbred*” (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

4.1.2 Legislação na experimentação animal

A lei mais antiga acerca do bem-estar animal surgiu na Inglaterra, em 1822, e proibia a crueldade aos grandes animais de produção – *Cruel Treatment of Cattle Act*. Já em 1824, surge a *Society for the Prevention of Cruelty to Animals* (REGIS; CORNELLI, 2012). A primeira legislação específica referente à experimentação animal foi o *British Cruelty to Animal Act*, em 1876, que implementava que a vivisseção deveria ser feita com anestesia e

quem trabalhasse com “experimentos” deveriam ter uma licença obtida previamente (FINN; STARK, 2015; TANSEY, 1998). Este sofreu uma atualização legal em 1986 que deu origem a um guia operacional – *Guidance on the operation of the animals (Scientific Procedures) Act* – e de um código de procedimentos técnicos – *Code of practice for the Housing and Care of Animals Used in Scientific Procedures* (REGIS; CORNELLI, 2012).

Já nos Estados Unidos, a primeira lei que versava sobre o uso de animais em pesquisa data de 1966 e é chamada de *Laboratory Animal Welfare Act*. Depois dela, várias foram as emendas e alterações complementando a lei, sendo a última em 2017. A característica mais importante foi a obrigatoriedade das comissões de ética institucionais no uso de animais, *Institutional Animal Care and Use Comittees – IACUC* (REGIS; CORNELLI, 2012; EUA, 2017).

No Brasil, a primeira documentação que abordava a proteção animal data de 06 de outubro de 1886 e estava no artigo 220 do Código de Posturas do Município de São Paulo. Constava nesta que, atos de maus tratos como castigos bárbaros e imoderados, em animais utilizados por cocheiros, ferradores, cavaleiros ou condutores de veículos de tração animal deveriam ser coibidos (SÃO PAULO, 1886). Em 1916, o artigo 47 do Código Civil mencionava que os animais eram objetos de propriedade do cidadão (GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016). A primeira norma a regulamentar e proteger os animais foi o Decreto 16.590/24 que proibia nas casas de diversões públicas as corridas de bovinos, brigas de aves, bem como toda e qualquer diversão que resultasse em maus-tratos aos animais, sendo este revogado pelo Decreto 11/91. Logo após, o Decreto-Lei 24.645/34 determinou em seu artigo 1º que todos os animais existentes no país fossem tutelados pelo Estado e, no artigo 2º, previu as sanções para quem praticasse maus-tratos aos animais (BRASIL, 1924; 1934; 1991; REGIS; CORNELLI, 2012).

No Decreto-Lei 3688 de 1941, também conhecido como “Lei das Contravenções Penais”, em seu artigo 64, fica estabelecida a penalidade de prisão simples aos atos de crueldades contra animais, independente da finalidade didática ou científica do ato. A partir de então verificou-se a necessidade de tipificar as condutas envolvendo animais também em laboratórios de pesquisas científicas ou em ambientes acadêmicos (BRASIL, 1941; REGIS; CORNELLI, 2012). Em virtude da ausência de legislação específica, o Projeto de Lei 1.507 foi apresentado em 1973 pelo Deputado Federal Peixoto Filho, acarretando sua transformação na Lei 6.638, de 1979, que estabeleceu as normas para as práticas didático-

científicas da vivisseccção dos animais. A Lei 6.638/79 autorizou, em todo território nacional, a prática da vivisseccção dos animais (Artigo 1º), excetuando-se os estabelecimentos de primeiro e segundo grau. A Lei previa, visando o bem-estar dos animais, que os mesmos só poderiam passar pelos procedimentos de vivisseccção anestesiados, sob supervisão de técnico especializado e o estudo deveria ser registrado em órgão competente e que animais sujeitos aos protocolos de pesquisa deveriam ter cuidados especiais (BRASIL, 1979; REGIS; CORNELLI, 2012).

A Lei de Crimes Ambientais (Lei 9.605) de 1998 veio para reordenar a lei ambiental brasileira no que se refere às infrações e punições, tornando ainda mais severa a pena para a prática de maus tratos em animais de modo geral ou para realização de experiências dolorosas ou cruéis em animais vivos, mesmo com a finalidade didática ou científica, na existência de recursos substitutivos (BRASIL, 1998; GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016).

A Lei Arouca, como ficou conhecida a Lei 11.794/08, revogou a Lei 6.638/79 e regulamentou o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal. Esta lei estabeleceu os procedimentos para uso científico de animais, atendendo aos anseios da comunidade científica por regulamentação e pondo fim à lacuna legal existente. O uso de animais para atividades educacionais em estabelecimentos de ensino superior e de educação profissional técnica de nível médio da área biomédica foi restringido, bem como afastou as práticas agropecuárias não experimentais do rol das técnicas de experimentação animal. Houve a determinação para criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) que é subordinado ao Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC); bem como a criação dos Comissões de Éticas no Uso de Animais (CEUAs), nas instituições que queiram realizar pesquisas envolvendo animais. As CEUAs, norteadas pelas resoluções do Concea serão responsáveis pela avaliação e fiscalização da utilização de animais (BRASIL, 2008; REGIS; CORNELLI, 2012).

4.2 Bem-estar e o princípio dos 3Rs

O bem-estar animal deve ser definido de forma que permita a relação com outros conceitos como: necessidade, liberdade, adaptação, felicidade, capacidade de previsão, sofrimento, dor, ansiedade, medo, estresse e saúde. Para avaliar o bem-estar é fundamental entender o universo artificial onde os animais vivem e compreender os aspectos da anatomia,

fisiologia, etologia e manejo das espécies em questão (FLAJBAT; AMARAL; RIVERA, 2008).

Em 1959, um projeto iniciado pela Federação das Universidades para o Bem-estar Animal (*Universities Federation for Animal Welfare – UFAW’s*), resultou na publicação dos “Princípios das Técnicas Experimentais Humanas” (*The Principles of Humane Techniques*) por Willian Russell e Rex Burch (1959). Essa publicação ficou conhecida como “O Princípio dos 3 Rs”, que é um programa de redução (*reduction*), refinamento (*refinement*) e substituição (*replacement*) de animais na experimentação. Porém, somente em 1980 foi observada a introdução desses princípios em leis e convenções internacionais. Algumas ações e metas fundamentais para o cumprimento dos objetivos do Programa dos 3 Rs:

Redução

- Desenvolver novos protocolos com a utilização de menor número de animais por experimento;
- Evitar replicação dos estudos conduzidos *in vivo*;
- Evitar a condução de estudos utilizando modelos animais que tem demonstrado irrelevância na extrapolação dos efeitos para espécie humana;
- Desenvolver metodologias *ex vivos* e *in vitro*, com intuito de usá-las como triagem (*screening*) para a identificação do efeito de relevância e para posterior investigação;
- Aperfeiçoar a qualidade técnica dos ensaios;
- Obter o maior número possível de informações relevantes em um pequeno número de animais (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).
- Experimentos em animais projetados e analisados de maneira apropriada, robustos e reprodutíveis e que realmente aumentam a base de conhecimento (NC3RS, 2019)

Refinamento

- Utilizar novas metodologias a partir do avanço técnico e científico e da investigação direcionada para os “*end points*”. Por esta razão, elementos qualitativos devem ser empregados, além da preocupação com a qualidade de vida do animal durante os procedimentos e a necessidade de reduzir o risco e grau de sofrimento deles (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

- Avanço da pesquisa em bem-estar animal, explorando as mais recentes tecnologias *in vivo* e melhorando a compreensão do impacto do bem-estar nos resultados científicos (NC3RS, 2019).

Substituição

- Desenvolver métodos alternativos à experimentação animal, como ensaios *in vitro*, inclusive com a utilização de células humanas (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

- Acelerar o desenvolvimento e o uso de modelos e ferramentas, com base nas mais recentes ciências e tecnologias, para abordar questões científicas importantes sem o uso de animais (NC3RS, 2019)

4.3 Eutanásia e Legislação Aplicada

Os celtas, povos divididos em tribos, que se espalharam pelo Oeste da Europa a partir do segundo milênio a.C., tinham o costume de abreviar a vida de seus familiares quando estes se tornavam velhos, vindo destes o início da prática de “eutanásia” como uma forma de se evitar um sofrimento eminente. Já na Índia a “eutanásia” era vista como um ato religioso, onde se realizavam cerimônias com o “barro sagrado”. O indivíduo doente tinha suas vias aéreas obliteradas com este material e então era jogado no rio Ganges como manda a tradição. Ainda no contexto religioso, na Bíblia, em Samuel; o Rei Saul clama por seu servo, após ser ferido, para que este tire sua vida. A ideia é sempre de abreviar um sofrimento (PAIVA, 2016).

Quando citamos os filósofos, há uma divisão nas opiniões, onde Sócrates (Grécia, 470 - 399 a.C.), Epicuro (Grécia, 341 – 271 a.C.) e Platão (Grécia, 427 – 347 a.C) mostraram-se favoráveis à eutanásia enquanto Aristóteles (Grécia, 384 – 322 a.C.), Hipócrates (Grécia, 460 – 377 a.C.) e Pitágoras (Grécia, 582 – 497 a.C.) não apoiavam. Cleópatra VII (69 – 31 a. C.) criou no Egito uma “Academia” para que fossem estudadas formas de se obter uma morte menos dolorosa (PAIVA, 2016).

Na obra de Caio Suetônio Tranquillus (69 d.C - 122 d.C) chamada “A vida dos doze Césares”, se lê pela primeira vez o termo eutanásia (PAIVA, 2016). O Imperador *Gaius Lullius Caesar Octavianus Augustus*, conhecido como Otávio César Augusto, desejava uma morte rápida e sem sofrimento, como fica claro no seguinte trecho da obra: “*A morte que o destino lhe concedeu foi suave, tal qual sempre desejara: pois, todas as vezes que ouvia dizer*

que alguém morrera logo e sem padecimentos, almejava para si e para os seus igual “eutanásia” (conforme a palavra que costumava empregar)” (SENADO FEDERAL, 2012). Já o intelectual Francis Bacon (1561-1626) em seu livro *“História vitae et mortis”*, define a eutanásia como método adequado de tratamento para as doenças incuráveis que gerassem sofrimento nos humanos (LIMA, 2008).

O Artigo 14 no parágrafo 1º da Lei Arouca regulamenta a eutanásia. Segundo esta, “o animal será submetido à eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, conforme as diretrizes do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, sempre que encerrado o experimento ou quando em qualquer de suas fases for tecnicamente recomendado aquele procedimento ou quando ocorrer intenso sofrimento”. O Concea periodicamente revisa e atualiza as suas diretrizes por meio das Resoluções Normativas (RN). A RN 37 normatiza a Diretriz da Prática de Eutanásia do Concea, em 15 de fevereiro de 2018, e está vigente até os dias atuais. Esta Diretriz se refere aos procedimentos de eutanásia realizados em animais incluídos em atividades de ensino ou de pesquisa científica, desde que sejam vertebrados vivos não humanos, das espécies classificadas no filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (BRASIL, 2018).

A eutanásia na visão do Concea constitui-se como o “modo humanitário de matar o animal, sem dor e com mínimo estresse. É a prática de causar a morte de um animal de maneira controlada e assistida”. A eutanásia se justifica, para o bem do próprio indivíduo, em casos de dor ou sofrimento, que não podem ser mitigados de imediato, com analgésicos, sedativos ou outros métodos. Quando o estado de saúde ou bem-estar do animal impossibilite o tratamento ou socorro (de acordo com o parágrafo 1º do artigo 14 da Lei nº. 11.794, de 2008) ou para fins didáticos ou científicos. O termo eutanásia será usado em todos os casos acima descritos, uma vez que as técnicas são similares (BRASIL, 2018).

A técnica humana (isto é, como provocamos a morte do animal) de eutanásia também é uma questão ética importante. Como veterinários e seres humanos, é nossa responsabilidade garantir que, se a vida de um animal for tirada, que isso seja feito com o mais alto grau de respeito e com ênfase em tornar a morte o mais indolor e sem sofrimento possível (AVMA, 2020).

A RN 37 do Concea, no Item 2, subitem 2.6, define que em atividades de ensino ou de pesquisa científica, o ponto final humanitário do experimento a ser estabelecido na proposta enviada a CEUA. Já na Resolução Normativa 23, de 23 de julho de 2015, referente a

Introdução Geral do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Concea, o ponto final humanitário é o momento no qual o encerramento é antecipado para que a dor, desconforto ou o distresse do animal sejam evitados, aliviados ou finalizados por ações como: i) adoção de tratamento para aliviar a dor, o desconforto ou o distresse; ii) interrupção de um procedimento doloroso; iii) exclusão do animal do estudo; ou iv) morte humanitária do animal (eutanásia) (BRASIL, 2018). Às vezes, é difícil determinar o ponto exato em que a dor, o distresse mudam de tolerável a intolerável. Assim os “*humane endpoints*” (pontos finais humanitários) são subjetivos, mas devem ser baseados em um julgamento profissional sólido, com a contribuição da equipe veterinária (SIVULA; SUCKOW, 2018).

Para um método de eutanásia ser aceito ele deve obedecer a alguns critérios: ser capaz de induzir perda de consciência e morte com um mínimo de dor e angústia; o tempo necessário para induzir a perda de consciência deve ser o menor possível; deve proporcionar confiabilidade, segurança do pessoal e irreversibilidade; compatibilidade com a finalidade e uso animal devem ser previstos; o efeito emocional em observadores ou operadores deve ser documentado; promover compatibilidade com subsequente avaliação, exame ou uso de material biológico obtido; promover compatibilidade com as espécies, idades e estado de saúde dos animais; manter o equipamento em boas condições de funcionamento; cuidar da disponibilidade de drogas e potencial abuso humano; oferecer segurança para predadores ou catadores, caso os restos mortais do animal sejam consumidos; atender aos requisitos legais; minimizar impactos ambientais do método ou disposição dos restos mortais do animal (AVMA, 2020; BRASIL, 2018).

Nesse mesmo Item 2 da RN 37, menciona-se a obrigatoriedade da figura do Responsável Técnico (RT) da instalação animal, o qual deve supervisionar, mesmo que de forma não presencial, a eutanásia. Este deve ter o título de Médico Veterinário com registro ativo no Conselho de Medicina Veterinária e Zootecnia (CRMV) da Unidade Federativa em que o estabelecimento está localizado. Cabe ressaltar que a Resolução Nº 1000 do CFMV de 11 de maio de 2012, que dispõe sobre Procedimentos e Métodos de Eutanásia em animais, foi consultada para a realização desta resolução normativa do Concea, assim como o “*Panel on Euthanasia*” de 2013 da AVMA (*American Veterinary Medical Association*) (Associação Americana de Medicina Veterinária), o código australiano “*Australian Code of practice for the care and use of animals for scientific purposes*” (Código australiano de prática para o cuidado e uso de animais para fins científicos) de 2004, o “*Canadian Council of Animal*

Care guidelines on euthanasia of animals used in science” (Conselho Canadense de Cuidados Animais: orientações sobre a eutanásia de animais utilizados na ciência) de 2010 e a Diretiva europeia de 2010 “*Directive 2010/63/EU of The European Parliament and of The Council on the protection of animals used for scientific purposes*” (Diretiva 2010/63 / EU do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à proteção dos animais utilizados para fins científicos); dentre outras legislações e normatizações mundiais pertinentes ao assunto (BRASIL, 2018; CFMV, 2012).

Os médicos veterinários e técnicos que trabalham no campo dos animais de laboratório podem enfrentar desafios éticos. Os médicos veterinários juraram usar seus “conhecimentos científicos e habilidade para o benefício da sociedade através da saúde e bem-estar animal, da prevenção e alívio do sofrimento animal e da preservação dos recursos animais, da promoção da saúde pública e do avanço do conhecimento médico” (NOLEN, 2011). De acordo com os princípios de bem-estar animal da AVMA, o uso responsável de animais para pesquisas conduzidas para benefício de humanos e animais é consistente com o juramento do médico veterinário. Um destes princípios estabelece que um veterinário deve fornecer assistência médica competente, com compaixão e respeito pelo bem-estar animal e pela saúde humana. Sob este princípio, a eutanásia de forma humanizada de animais é descrita como um procedimento veterinário ético. Estes devem usar sua experiência e conhecimentos para garantir o cuidado ético do uso de animais em pesquisa, promover práticas humanitárias de eutanásia e encorajar o refinamento de procedimentos consistentes com diretrizes e regulamentos (SIVULA; SUCKOW, 2018)

4.3.1 Métodos de eutanásia para roedores

No Brasil, toda a experimentação animal é regida pelo CONCEA e fiscalizada pelas CEUAs institucionais. Os métodos de eutanásias descritos e aprovados pelo CONCEA estão no Quadro 1 (BRASIL, 2018).

Quadro 1 Métodos de eutanásia estabelecidos pela RN 37/Concea

<p>Classe: Mammalia Ordem: Rodentia: camundongos, ratos, hamster, gerbil, cobaias</p>
<p>Métodos Recomendáveis</p>
<p>Anestésicos gerais barbitúricos: aplicados pelas vias intravenosa ou intraperitoneal (em casos excepcionais quando da impossibilidade de administração intravenosa). Anestésicos gerais intravenosos: como exemplo, o propofol. Anestésicos gerais inalatórios: como exemplo, o isoflurano. Sobredosagem da associação de anestésicos dissociativos: por exemplo: cetamina e agonistas de adrenorreceptores alfa-2 (por exemplo: xilazina) administrada pelas vias intravenosa, intramuscular ou intraperitoneal (em casos excepcionais quando da impossibilidade de administração intravenosa). Após a perda do reflexo corneal, os métodos acima podem ser complementados por cloreto de potássio associado ou não a bloqueador neuromuscular, ambos por via intravenosa.</p>
<p>Métodos Aceitos Com Restrição</p>
<p>CO₂: desde que sejam seguidas as recomendações desta diretriz referentes ao item 8.13.5. Deslocamento cervical: ratos <150 g, camundongos. Decapitação: com equipamentos comerciais de uso específico tipo guilhotina (lâminas e tesouras afiadas apenas em neonatos). Micro-ondas: específicos para esta finalidade (não é aceito micro-ondas de uso doméstico). Congelamento rápido ou nitrogênio líquido: para fetos e neonatos de ratos e camundongos. Atordoamento, seguido de exsanguinação: apenas em animais silvestres em situações de campo.</p>
<p>Métodos Inaceitáveis</p>
<p>Éter, clorofórmio, nitrogênio, argônio e outros métodos não descritos nesta diretriz.</p>

Fonte: BRASIL, 2018

4.3.1.1 A eutanásia por anestésicos inalatórios em neonatos

O item 4.9 da RN 37 do CONCEA refere que os neonatos são muito resistentes ao efeito do dióxido de carbono (CO₂) e de outros agentes que causam hipóxia, e indica que, neste caso, outros métodos devem ser utilizados, como, por exemplo, o deslocamento cervical em camundongos. A RN indica ainda, que os fetos com idade maior que dois terços da fase de desenvolvimento e neonatos devem ser submetidos aos mesmos métodos de eutanásia que os congêneres adultos da mesma espécie.

O item 9.1.1 da RN 37 do CONCEA assegura que a eutanásia da mãe ou a remoção do feto em camundongo, rato e hamster até o 14º dia de gestação ocasiona morte rápida pela perda do suprimento sanguíneo, sendo um método aceitável para fetos até esta idade. A partir do 15º dia de gestação de camundongo, rato e hamster recomendam-se as mesmas técnicas consideradas para os animais adultos. Sempre que possível, o método de escolha para a eutanásia da mãe deve assegurar anóxia cerebral rápida para o feto. A RN também menciona que para roedores e lagomorfos neonatos de até 7 dias, a decapitação com instrumentos que apresentem lâminas adequadas é um método aceito com restrição; e que para animais jovens e adultos de camundongos, hamsters, ratos ou cobaias; pode-se utilizar caixa hermeticamente fechada, com algodão embebido em halotano, isoflurano ou sevoflurano, desde que não haja contato direto do animal com o algodão, devendo ser a caixa transparente para a visualização do momento do óbito do animal, confirmado a seguir pela ausência de reflexo corneal e batimentos cardíacos (BRASIL, 2018). O₂ suficiente deve ser fornecido durante o período de indução dentro da caixa para evitar hipóxia. No caso de pequenos roedores colocados em um recipiente grande, haverá O₂ suficiente na câmara para evitar hipóxia (AVMA, 2020).

Os métodos de eutanásia que envolvem agentes voláteis são geralmente fáceis de usar e podem ser usados para eutanásia de um maior número de animais de uma única vez. Esta abordagem é comumente usada para eutanásia de roedores. Dentre os agentes voláteis, temos os anestésicos inalatórios dos quais o isoflurano é o mais usado. Quando administrados em *overdose*, podem ser usados para a eutanásia de animais. Geralmente, os anestésicos inalatórios são administrados das formas já citadas anteriormente. O acúmulo de altas concentrações de anestésicos podem ser angustiante para os animais e existe o risco de exposição do pessoal ao gás residual (SIVULA; SUCKOW, 2018).

Vapores e gases inalados requerem uma concentração crítica dentro dos alvéolos e sangue para terem o efeito desejado. Assim todos os métodos inalatórios têm o potencial de afetar adversamente o bem-estar do animal, pois o início da inconsciência não é imediato. A angústia pode ser criada pelas propriedades do agente (p.ex.: hipóxia, odor pungente, hipercarbia) ou pelas condições em que o agente é administrado (p.ex.: na própria gaiola, em câmara para eutanásia, se por preenchimento gradual ou pré-preenchimento da caixa.). Se um animal não estiver morto após exposição ao anestésico inalatório, a exposição deve ser repetida ou seguida com outro método de eutanásia (AVMA, 2020).

A utilização de métodos inadequados para realizar a eutanásia de animais pode causar-lhes dor, angústia e sofrimento consideráveis. O nível de competência da pessoa que efetua esta operação é igualmente importante. Por conseguinte, os animais só deverão ser submetidos à eutanásia por uma pessoa competente utilizando um método adequado à espécie em questão. Nesta mesma diretiva europeia em questão é destacado como método de eutanásia aceito para roedores a overdose anestésica, porém não são informados quais os agentes podem ser utilizados. O deslocamento cervical pode ser utilizado em roedores com menos de 1Kg, porém os animais acima de 150g devem ser previamente sedados (PARLAMENTO E CONSELHO EUROPEU, 2010).

Nos testes de aversão e avaliação comportamental todos os agentes inalatórios atualmente utilizados foram identificados como aversivos em graus variados. A aversão é uma medida de preferência que não necessariamente implica que a experiência seja dolorosa. Os agentes identificados como menos aversivos como a mistura de argônio com óxido nitroso e os anestésicos inalatórios, ainda assim, em algumas condições de administração, como preenchimento gradual da caixa, apresentaram evidência nos animais de comportamento de angústia como por exemplo, respiração com a boca aberta (SHARP; AZAR; LAWSON, 2006). O fato de agentes inalados produzirem angústia e aversão nas pessoas suscita preocupação quanto ao seu uso em animais (INTERAGENCY RESEARCH ANIMAL COMMITTEE, 2015). Em animais usados em testes, pesquisas e treinamentos devemos utilizar o princípio de que “a menos que seja estabelecido o contrário, os pesquisadores devem considerar que os procedimentos que causam dor e angústia em seres humanos podem causar dor e angústia em outros animais”. Curiosamente mais de 40% das crianças entre 2 e 10 anos de idades mostram comportamento de angústia durante a indução com o sevoflurano, com 17% tendo sofrimento significativo e mais de 30% de resistência física durante a indução (CHORNEY; KAIN, 2009). O medo da anestesia em crianças pode ser pelo odor, sensação desagradável com a máscara ou uma verdadeira fobia à máscara. Apesar de todas as evidências de angústia e aversão, os anestésicos inalatórios continuam sendo administrados pois, o

benefício associado ao uso supera muito qualquer sofrimento ou aversão que podem ser causados (AVMA, 2020).

4.3.1.2 A eutanásia por anestésicos injetáveis, decapitação e CO₂

O uso de agentes anestésicos injetáveis para eutanásia é um dos métodos mais rápidos e confiáveis. Geralmente é o método de escolha para não causar medo ou angústia no animal (LEWBART, 2006). Quando administrados adequadamente, esses agentes proporcionam uma suave perda de consciência antes da cessação da função cardíaca e/ou respiratória, minimizando dor e angústia para o animal (WILKINS III; BOWMAN, 1997). A utilização da via intravenosa para administração desses anestésicos, irá permitir sua atuação diretamente no sistema vascular, permitindo rápida distribuição para o cérebro ou centros neurais, resultando em rápida perda de consciência (LEWBART, 2006). Quando a contenção do animal for necessária para a utilização da via intravenosa ou a manipulação deste oferecer risco ao operador, poderá ser utilizada uma sedação prévia (AVMA, 2020). Nos casos onde a administração intravenosa é considerada impossível, a administração intraperitoneal (IP) ou intracelomática de um barbitúrico não irritante ou outra solução aprovada é aceitável (BUCHER; BUCHER; WALZ, 1979). Em roedores de laboratório, a adição de lidocaína ou bupivacaína ao barbitúrico reduziu as contorções abdominais após a administração intraperitoneal. Com a utilização de agentes injetáveis para eutanásia administrados pela via intraperitoneal, vê-se a demora destes em passar pelos estágios I e II da anestesia (GRIER; SCHAFFER, 1990). Por conseguinte, estes devem ser colocados em pequenos recintos em áreas tranquilas para minimizar a excitação e o trauma (SCHOELL *et al.*, 2009). Como vantagem de utilização dos barbitúricos, temos a rápida ação, quando administrados pela via intravenosa e na dose adequada. As desvantagens são elencadas a seguir: a) para uma utilização padrão-ouro é primordial a utilização da via intravenosa, isso requer treinamento pessoal e é impeditiva sua utilização dependendo do tamanho do animal em questão; b) o animal deve ser previamente imobilizado; c) alguns animais podem passar por uma fase excitatória e/ou apresentar um suspiro terminal esteticamente censurável, o que pode ser angustiante para o operador (AVMA, 2020).

A decapitação é um método físico usado, principalmente, para pequenos animais, como roedores, quando os tecidos ou fluidos corporais devem ser recuperados rapidamente após a eutanásia. As guilhotinas estão comercialmente disponíveis para este fim e é importante que exista uma manutenção de rotina. É importante que o animal seja imobilizado de forma correta para que o procedimento resulte na morte do animal e não em ferimentos graves. Este método pode ser

visualmente desagradável para o operador. É preferível usar a decapitação para eutanásia quando combinada com anestesia (HOLSON, 1992; SIVULA; SUCKOW, 2018), a não ser que a anestesia interfira no resultado da pesquisa como descrito na RN 37 (item 8.14.9). Lembrando que, nesta mesma RN, a decapitação com instrumentos que apresentem lâminas adequadas é um método aceito com restrições para roedores e lagomorfos neonatos de até 7 dias de vida. Segundo a Resolução N° 1000 do CFMV, este método é utilizável também com restrição em roedores e pequenos mamíferos, desde que sejam animais com peso inferior a 200g. Cabe ressaltar que, se a inconsciência não ocorrer pelo trauma da decapitação, esta ocorrerá prontamente pela perda de sangue e hipóxia. A decapitação gera um potencial de corrente contínua por 2 a 4 segundos de duração, que foi acompanhado por traçado de EEG (eletroencefalograma). Esta ativação desapareceu na maioria dos estudos com 13-14 segundos após a decapitação e em alguns episódios ocasionais a ativação permaneceu além dos 14 segundos (HOLSON, 1992). A interpretação da atividade elétrica do cérebro, que pode persistir por até 30 segundos após esse método, tem sido controversa. Os métodos de EEG não podem fornecer respostas definitivas quanto ao início da inconsciência (AVMA, 2020).

Apesar do CO₂ apresentar efeito analgésico e anestésico geral em altas concentrações, não é um método humanitário para nenhuma espécie. Concentrações a partir de 40-50% são desagradáveis para os seres humanos, pois levam à formação de ácido carbônico na cavidade oral e acima de 50% são nocivas. Alguns autores descreveram que o CO₂ irrita as mucosas humanas com concentrações acima de 10%. Este fenômeno também ocorre nos animais. Em contrapartida, o tempo até a inconsciência é inversamente proporcional à concentração utilizada. Diversos efeitos adversos são observados em cães, como dispneia, ataxia, espasmos musculares, micção, salivação, defecação, contrações tônicas e convulsões, o que torna este método inaceitável nesta espécie (BRASIL, 2018; POWELL; ETHUN; TAYLOR, 2016). O uso do CO₂ como um agente de eutanásia, bem como a sua forma de administração, ainda está em debate. No entanto, para roedores, exceto neonatos, mantidos em instalações de produção, esse é um método aceito, desde que sejam seguidas as seguintes recomendações em relação ao preenchimento da câmara de eutanásia. Passa a ser aceito desde que seja utilizado em câmaras específicas que possam mensurar o fluxo de CO₂, por meio de fluxômetro, para causar a morte em roedores deve-se preencher a câmara com um fluxo de 100% de CO₂ na ordem de 20% do volume da câmara por minuto e manter o fluxo por pelo menos um minuto após a morte clínica (BRASIL, 2018). Recentemente, a AVMA (*American Veterinary Medical Association*) atualizou seu *guideline*, especificamente no que concerne ao uso do CO₂, e passou a preconizar a utilização do preenchimento da câmara ou gaiola

com de 30 a 70% da mesma por minuto de CO₂, diferentemente do que era preconizado em 2013, que seria de 10 a 30% do volume da gaiola/min de CO₂ (AVMA, 2020). Seu uso tem sido questionado, pois estudos mostram que a exposição ao CO₂ causa aversão em ratos e camundongos, demonstrada por vários testes comportamentais, como teste de vocalização ultrassônica, de preferência, testes de aproximação e evitação e o teste de aversão-evitação. Além dos achados comportamentais, ratos e camundongos submetidos à eutanásia com CO₂ (pré-preenchidos ou preenchidos gradualmente) apresentaram várias alterações histopatológicas do pulmão, como hemorragia e edema perivascular (BOIVIN *et al.*, 2017; CHISOLM *et al.*, 2013; MARQUARDT *et al.*, 2018; MOODY; CHUA; WEARY, 2014; THOMAS; FLECKNELL; GOLLEDGE, 2012; WONG; MAKOWSKA; WEARY, 2013).

Em estudo de 2016 realizado com neonatos de 6 dias de camundongos foi relatado que a utilização de CO₂ para a eutanásia de neonatos pode levar até 50 minutos, e que essa exposição prolongada é em parte devido à tolerância a hipóxia que estes animais jovens possuem (SEYMOUR; NAGAMINE, 2016).

É importante ainda ressaltar que, para neonatos de camundongos, a RN 37 do Conceia recomenda que, dois métodos aceitáveis para a espécie devem ser combinados e a morte deve ser confirmada utilizando os sinais que indiquem o óbito, pois devem ser levados em consideração que neonatos são mais resistentes à hipóxia e a biotransformação dos fármacos é mais lenta nestes (BRASIL, 2018).

4.4 Anestesia e Agentes Inalatórios

Uma boa anestesia em roedores permite a indução de insensibilidade imediata e permanente sem ou mínima angústia para o animal (BOIVIN *et al.*, 2017). Os anestésicos gerais induzem a depressão generalizada e reversível do sistema nervoso central (SNC). A anestesia geral provoca a perda da percepção de todas as sensações. O estado anestésico inclui perda da consciência, amnésia e imobilidade (ausência de resposta a estímulos nocivos), mas não necessariamente analgesia completa. Outros efeitos desejáveis provocados pelos anestésicos ou adjuvantes durante a cirurgia incluem relaxamento muscular, perda dos reflexos autônomos, analgesia e ansiólise (estado de tranquilidade induzido por medicamentos) (WOUNDEN; MILLER, 2014). É necessário fazer uma distinção entre os termos sedação, tranquilização e anestesia. Uma característica comum de sedativos e tranquilizantes é que o estado consciente pode acontecer dependendo de estímulos utilizados, de modo que os animais sedados ou imobilizados com esses agentes ainda possam estar

conscientes e conectados ao seu ambiente. Embora sedativos, agentes hipnóticos e tranquilizantes, quando administrados em quantidade suficiente possam produzir um estado semelhante ao sono, os seres humanos podem se lembrar do ambiente onde estavam, demonstrando consciência, tal fato se aplica aos animais. Não se deve confiar em agentes imobilizadores, tranquilizantes ou sedativos para produzir um estado inconsciente, desconectado e verdadeiramente sem resposta, independentemente da dose administrada. Em vez disso, uma dose eficaz de anestésico geral deve ser utilizada ao realizar a eutanásia com métodos que causam sofrimento ou estímulo nocivo antes da perda de consciência (AVMA, 2020).

Os anestésicos produzem inconsciência, impedindo a integração (bloqueando interações entre regiões cerebrais especializadas) ou reduzindo as informações (diminuindo o número de padrões de atividade disponíveis para redes corticais) recebidas pelo córtex cerebral ou estruturas equivalentes. Além disso, a perda abrupta de consciência que ocorre em uma concentração crítica de anestésico implica que o repertório integrado de estados neurais subjacentes à consciência possa entrar em colapso não linearmente. Dados entre espécies sugerem que a memória e a consciência são abolidas com menos da metade da concentração necessária para cessar o movimento. Assim, um estado anestésico (inconsciência e amnésia) pode ser produzido em concentrações anestésicas que não impedem movimentos físicos (ALKIRE; HUDETZ; TONONI, 2008; ANTOGNINI; BARTER; CARSTENS, 2005).

Medições da função elétrica do cérebro foram usadas para quantificar objetivamente o estado inconsciente. Em algum nível entre a falta de resposta comportamental e a indução de um plano (indicando a cessação da atividade elétrica e da morte cerebral) pelo EEG (eletroencefalograma), a consciência deve desaparecer. No entanto, os dados do EEG não podem fornecer respostas definitivas quanto ao início da inconsciência. Os monitores da função cerebral baseados no EEG são limitados em sua capacidade de indicar diretamente presença ou ausência de inconsciência, especialmente em torno do ponto de transição. Além disso, nem sempre está claro quais padrões de EEG são indicadores de ativação por estresse ou dor (AVMA, 2020).

Em estudo realizado em 2002, os autores descobriram que os vapores anestésicos inalatórios estão associados a algum grau de aversão em roedores de laboratório, com aversão crescente observada à medida que a concentração aumenta. Wong, Makowska e Weary (2013) também relataram que o halotano e o isoflurano são aversivos aos ratos *Wistar* machos, porém menos que o CO₂ (AVMA, 2020; LEACH *et al.*, 2002).

A farmacodinâmica dos anestésicos inalatórios indica que a perda da consciência e a amnésia sejam decorrentes da ação supraespinhal (isto é, no tronco encefálico, mesencéfalo e córtex cerebral) e a imobilidade em resposta a estímulos nocivos seja causada por depressão das vias sensoriais e motoras supraespinhais e espinhais. A concentração alveolar mínima (CAM) é a pressão parcial alveolar que resulta na anestesia mais leve possível. Especificamente, a CAM é a pressão parcial que extingue o movimento em resposta a uma incisão cirúrgica em 50% dos pacientes. A potência de um anestésico está inversamente relacionada à sua CAM. Se a CAM é pequena, a potência é alta, e uma pressão parcial relativamente baixa será suficiente para causar anestesia. Os anestésicos inalatórios mais utilizados possuem as seguintes potências, de acordo com a CAM, seguindo do mais potente para o menos potente: Halotano = 0,0077, Isoflurano = 0,0114, Enflurano = 0,0168, Éter Dietílico = 0,019, Sevoflurano = 0,02, Desflurano = 0,06 e Óxido Nitroso = 1,01. A variabilidade de resposta dos pacientes a uma determinada dose de anestésico é pequena. Portanto, em todos os pacientes, os níveis de anestésico que causam parada respiratória e cardíaca são muito próximos dos níveis que causam anestesia geral (FLEKNELL, 2009; RANG *et al.*, 2016; STACHNIK, 2006; STEFFEY; MAMA, 2007; VENTICINQUE; ANDREWS, 2018; WOUNDEN; MILLER, 2014). A CAM de camundongos para o isoflurano é 1,66% (ROSA *et al.*, 2015). O mecanismo de ação dos anestésicos inalatórios, é de difícil compreensão; para ajudar na compreensão estes foram divididos em três níveis: o macroscópico, o microscópico e o molecular. Mais recentemente, alguns autores descrevem estes mecanismos de ação como: orgânicos, celulares e inibitórios da entropia (desordem de um sistema) na tentativa de explicar o estado de anestesia que teria como característica a capacidade de prover ao paciente apenas duas ações principais: 1) imobilidade, inibição da resposta a estímulos nociceptivos; 2) amnésia. Outros efeitos igualmente desejáveis também são obtidos pela administração dos anestésicos: analgesia e hipnose. Entretanto, estes últimos, em conjunto ou isoladamente, não definem o estado de anestesia (SARAIVA, 2002).

Agentes anestésicos inalatórios são denominados voláteis porque, como outros líquidos voláteis, eles possuem uma alta propensão para evaporar ou vaporizar. Quando um líquido desse grupo é exposto ao ar ou outros gases as moléculas na superfície do líquido que possuem energia suficiente escapam da fase líquida e entram na fase de vapor. Esse processo é conhecido como evaporação, o que é puramente um fenômeno de superfície. Se esse processo ocorre dentro de um ambiente fechado, como a câmara de vaporização de um vaporizador anestésico de *bypass* variável, o número de moléculas que entram na fase de vapor, então, permanece constante e nota-se que o vapor está saturado com anestésico. Nesse ponto de equilíbrio evaporativo, as moléculas do

anestésico em fase de vapor ficam bombardeando as paredes do recipiente e criando uma pressão parcial conhecida como pressão de vapor saturado ou, simplesmente, pressão de vapor. A pressão de vapor é uma propriedade física, onde cada substância possui a sua. Ela depende da temperatura e não é afetada por alterações na pressão barométrica/ atmosférica. Se a temperatura de um líquido, como o isoflurano por exemplo, for diminuída, a evaporação também será diminuída. Isto porque menos moléculas possuem energia suficiente para entrar na fase de vapor (VENTICINQUE; ANDREWS, 2018).

As propriedades físicas e químicas do isoflurano (1-cloro-2,2,2, trifluorometil éter) (KRAHN; LIMBERGER; GUTERRES, 2010) são conhecidas desde a década de 70 e algumas são: seu peso molecular varia de 184 a 185 (BRUNSON, 1997; FONSECA *et al.*, 2011; STEFFEY; MAMA, 2007), ponto de ebulição de 48,5-49°C (STEFFEY; MAMA, 2007) e pressão de vapor à 24°C (STEFFEY; MAMA, 2007). Já concentração de vapor saturado (SVC) do isoflurano em % relativo à temperatura ambiente (20°C) em um ambiente equilibrado (saturado) varia de 31 a 33% (AVMA, 2020; BRUNSON, 1997; FLEKNELL, 2009; VENTICINQUE; ANDREWS, 2018) e a pressão de vapor à 20°C é de 238-240 (BRUNSON, 1997; STEFFEY; MAMA, 2007; VENTICINQUE; ANDREWS, 2018). O isoflurano é um líquido não inflamável em contato com o oxigênio, ar e óxido nitroso sob condições normais. Possui características fotoestáveis frente à radiação ultravioleta (UV) e possui um coeficiente de solubilidade sangue/gás intermediário de 1,4, que lhe confere uma potência anestésica média com rápida indução e recuperação anestésica (KRAHN; LIMBERGER; GUTERRES, 2010).

Brunson (1997) descreveu os seguintes volumes necessários para produzir várias concentrações anestésicas de isoflurano (Tabela 1):

Tabela 1- Quantidade de isoflurano líquido necessário para produzir concentrações percentuais em câmaras com volume conhecido

Volume interno da câmara anestésica (em mL)					
Concentração de Isoflurano (%)	1000	2000	3000	4000	5000
1	0,05*	0,10	0,15	0,20	0,26
2	0,10	0,20	0,31	0,41	0,51
3	0,15	0,31	0,46	0,61	0,77
4	0,20	0,41	0,61	0,82	01,02
5	0,26	0,51	0,77	1,02	1,28

* Volume em mL. Calculado em 20°C e 760mmHg (1 atm), nível do mar.

Hodgson (2007), para determinar o volume de mL necessários de isoflurano para esse estudo ou outros tamanhos de caixas, utilizou as seguintes fórmulas. Considerando que 1 polegada cúbica equivale a 16.387 mL e que o estudo foi realizado em local à 321 metros acima do mar, que corresponde a 735mmHg de pressão barométrica e temperatura ambiente de 20 °C; nesta configuração, 1mL de isoflurano líquido produz 201mL de vapor. Portanto, incluímos fórmulas nas quais o volume é expresso em polegadas cúbicas (fórmula de polegadas cúbicas) ou mililitros (fórmula de mililitros). Essas fórmulas são derivações matemáticas, em que o percentual desejado é expresso como um número e não uma fração (por exemplo, 2% e não 0,02), como também é possível visualizar na Tabela 2.

$$\text{mL isoflurano líquido} = \frac{\text{volume da câmara (mL)} \times \% \text{ desejado}}{\text{pressão de vapor} \times 100}$$

Tabela 2 - Volumes de isoflurano necessários para gerar índices (%) desejados em caixas de volume conhecido

Volume da Caixa (L)	Concentração de Isoflurano (%) desejada	Volume de Isoflurano (mL)
171	5	42,8
171	3	25,7
57,4	5	14,3
57,4	3	8,6

20°C e 735 mmHg/não está à nível do mar (760 mmHg). Adaptada de HODGSON (2007).

Quando se descreve a proporção de um gás em uma amostra contendo uma mistura de gases, podemos nos referir a cada um dos gases individualmente em termos de sua pressão parcial (mmHg) ou de seu percentual em relação ao volume referente ao volume da soma de todos os gases presentes, o volume por volume percentual (v/v%).

$$\text{Volume percentual} = \frac{\text{Volume de gás}}{\text{Volume total de gás}}$$

O volume que um gás ocupa em uma dada temperatura e pressão está relacionado ao número de moléculas presentes do gás, não ao tamanho (tipo) das moléculas, isso é conhecido como Hipótese de Avogadro (VENTICINQUE; ANDREWS, 2018).

$$\text{Volume percentual} = \frac{\text{Pressão parcial de um gás (mmHg)}}{\text{Pressão atmosférica (mmHg)}}$$

Quando uma molécula de líquido se evapora para fase gasosa, é preciso haver um gasto de energia, porque as moléculas de um líquido são coesas. A quantidade de energia que é consumida por um líquido específico quando ele é convertido em vapor é denominado de calor latente de vaporização. A energia para a vaporização deve ser proveniente do próprio líquido e, na ausência de uma fonte de energia externa, a temperatura do líquido diminui durante a vaporização. Essa perda de energia pode levar a reduções significativas da temperatura no líquido remanescente, o que irá reduzir a pressão de vapor e a subsequente vaporização. A menos que o efeito de resfriamento evaporativo do agente anestésico líquido seja mitigado e compensado, o rendimento do vaporizador vai diminuir (Tabela 3) (VENTICINQUE; ANDREWS, 2018).

Tabela 3- Índice de relação de vaporizador de Bypass variável

Concentração do Isoflurano (v/v%)	Câmara de Derivação (<i>Bypass</i>) – para Câmara de Vaporização- razões de divisão à 20°C * - ISOFLURANO
1	45:1
2	22:1
3	14:1

*razão entre o gás fresco que flui através da câmara de *bypass* em relação à câmara de vaporização para as concentrações de saída listadas. O dispositivo de compensação de temperatura pode alterar a relação real, isto se aplica apenas aos vaporizadores de *bypass* variável (VENTICINQUE; ANDREWS, 2018).

Calculado a partir de:

$$\% \text{ de saída de agente volátil} = \frac{100 \times P_v \times F_v}{FT (P_a - P_v)}$$

$$FT (P_a - P_v)$$

Onde:

P_a = pressão atmosférica

P_v = pressão de vapor à 20°C

F_v = fluxo de gás fresco através da câmara de vaporização (mL/min)

FT = fluxo total de gás fresco (mL/min)

O alívio da dor (analgesia) pode ou não ocorrer com uma pressão parcial menor do que a necessária para anestesia cirúrgica. PA 50 é a pressão parcial em que 50% dos pacientes perdem a nocicepção e o índice analgésico é a razão entre a CAM e a PA 50. Um índice analgésico alto significa, que a analgesia é induzida em uma pressão parcial de anestésico muito menor do que a necessária para anestesia cirúrgica. Por exemplo: o óxido nitroso tem um alto índice analgésico e

é um bom analgésico, ao passo que o halotano tem baixo índice analgésico e é um analgésico insatisfatório. A farmacocinética deve ser levada em conta pelos anestesistas, este deve circular no pequeno espaço entre permitir que um paciente desperte e causar depressão bulbar, prevenindo efeitos de várias respostas fisiológicas e doenças sobre profundidade da anestesia. Os planos de profundidade anestésica são respectivamente: 1- Etapa de indução anestésica (início da administração do anestésico geral e perda da consciência); 2- Etapa de excitação (perda de consciência até início da respiração regular); 3- Etapa de anestesia cirúrgica (começa com a regularização da respiração e termina com a paralisia bulbar); 4- Etapa de paralisia bulbar (intensa depressão do centro respiratório e vasomotor do bulbo, parada respiratória, colapso cardiovascular e morte) (CASTELLANOS-OLIVARES *et al.*, 2014; WOUNDEN; MILLER, 2014).

Na modalidade anestesia inalatória, o agente anestésico é inalado pelo animal, normalmente por meio de uma câmara de inalação (algodão embebido em anestésico dentro de uma câmara de inalação transparente), máscara facial/câmara de indução ou tubo endotraqueal. Tanto a máscara facial/câmara de indução quanto o tubo endotraqueal são conectados a um vaporizador calibrado onde a quantidade de anestésico administrada é conhecida e controlada (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2016).

Estudo anterior recomendou a não utilização de overdose de anestésicos inalatórios para a eutanásia de roedores neonatos, devido à demora para inconsciência e parada cardíaca. No entanto, este estudo utilizou vaporizador anestésico calibrado ao seu nível máximo de 5% (TRANQUILLI; THURMON; GRIMM, 2007). Seymour e Nagamine citaram em 2016 que nenhum estudo havia sido feito para investigar o tempo necessário para a eutanásia de camundongos neonatos através da inalação de isoflurano sob pressão de vapor saturado à temperatura de ambiente (31% a 760mmHg e 20°C). A hipótese levantada por eles é que o isoflurano na forma de pressão de vapor saturado seria mais eficaz do que o CO₂ nesse contexto. Então eles realizaram estudo utilizando 76 neonatos de camundongos (C57BL/6 e CD1), divididos em 7 grupos (3 a 18 por grupo) colocados no interior de bolsas plásticas transparentes seláveis tipo Ziplock®, um pedaço de material absorvente de 5 cm² e 0,5mL de isoflurano. Os animais foram monitorados quanto à cor, movimentação e respiração, sendo avaliados LORR e LOPR, tudo através da bolsa plástica, onde permaneceram 30 minutos dentro da bolsa. Posteriormente, foram colocados em superfície com toalhas de papel à temperatura ambiente (20°C) e monitorados a cada 5 minutos por 120 minutos. A parada respiratória, LORR e LOPR foram percebidas aos 2 minutos de exposição ao isoflurano. A recuperação foi definida como o neonato tendo readquirido respiração espontânea e regular, movimento voluntário e mucosas novamente rosadas. 23,7% dos

neonatos se recuperaram no intervalo de tempo de 30 a 120 minutos pós-exposição ao isoflurano. A eutanásia foi confirmada em todos os animais por decapitação, imediatamente após o experimento (SEYMOUR; NAGAMINE, 2016).

Os animais neonatos têm uma suscetibilidade aumentada à hipotermia e podem também ter má função pulmonar e circulatória. Eles frequentemente têm baixa reserva energética, o que pode causar problemas durante o período de recuperação. Além disso, qualquer período de jejum por remoção da mãe pelo período da anestesia e recuperação pode levar ao esgotamento rápido dos estoques de glicogênio hepático e resultar em hipoglicemia. Dependendo das espécies, os neonatos têm uma capacidade reduzida de detoxificar uma ampla gama de medicamentos e, portanto, as respostas aos anestésicos podem diferir consideravelmente àquelas dos animais adultos. Ao anestésiar neonatos, é essencial manter a temperatura corporal, manter uma boa ventilação e manter o equilíbrio de fluidos. Em espécies como cães, gatos, ovelhas e porcos, os vasos umbilicais fornecem uma via conveniente para infusão intravenosa. É preferível usar anestésicos inalatórios para que a recuperação seja rápida e a alimentação normal seja retomada o mais rápido possível. O isoflurano foi relatado como seguro e eficaz. Os animais neonatos geralmente requerem maiores concentrações de anestésico, p.ex.: ratos adultos jovens requerem uma concentração de aproximadamente 2% de halotano para manutenção da anestesia cirúrgica, enquanto os neonatos requerem de 2 a 3% (FLEKNELL, 2009).

Em linhas gerais, a AVMA (2020) preconiza que os anestésicos inalatórios podem ser administrados como o único agente de eutanásia ou como parte de um processo de duas etapas, onde os animais primeiramente se tornam inconscientes através da exposição ao anestésico inalatório e, posteriormente, são mortos por um método secundário. A ordem de preferência é isoflurano, halotano, sevoflurano, enflurano, metoxiflurano e desflurano, com ou sem óxido nitroso (N₂O). Óxido nitroso não deve ser usado sozinho. O metoxiflurano é aceitável apenas quando outros agentes e métodos não estão disponíveis. O éter não é aceitável para a eutanásia. Embora aceitáveis, anestésicos inalatórios geralmente não são usados para animais maiores por causa do custo e da dificuldade de administração. Os operadores expostos a esses agentes devem cumprir as normas e regulamentos federais de saúde e segurança ocupacional. Os animais neonatos exigirão exposição prolongada a esses agentes (AVMA, 2020).

4.5 Dor, Distresse, Estresse e Constatação do óbito em neonatos

No Egito, antes de 2000 a.C., ao coração foi dada preeminência como órgão de transporte e capacidade humana e o cérebro foi considerado de pouca importância; assim, na prática egípcia, tinha-se o cuidado de salvar o coração e descartar o cérebro no ato de embalsamamento dos corpos. O cânone chinês da medicina Nei Ching, que tem história datada de 2600 a.C., também dava grande importância para o coração e outros órgãos no controle dos fluxos de força (*ying* e *yang*) que se presumia regular a vida. Desta forma, pode-se observar uma visão limitada de anatomia e das funções de partes do corpo. Somente na Grécia, entre os séculos V e VII a.C. a dor foi relacionada ao cérebro e a nervos, e não ao coração. Sempre houve uma associação entre dor física, preceitos religiosos, interesses políticos e sofrimento social, isso só passou a ser questionado em meados do século XIX, com o isolamento da morfina e com o consequente desenvolvimento dos opioides, identificação dos receptores neurológicos e da transmissão dos impulsos nervosos (PAIVA, 2016; TRINDADE, BATISTA e SILVA, 2013).

A palavra dor se origina do latim *dolor*, sendo um dos cinco pontos cardinais da inflamação. De acordo com a *Association for the Study of Pain* (IASP, 2011), a dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Este conceito nos permite dizer que a dor é uma experiência única e individual, modificada pelo conhecimento prévio de um dano que pode ser existente ou presumido. A *Joint Commission Accreditation of Healthcare Organizations* (JCAHO) no ano 2000 publicou uma norma que descreve a dor como quinto sinal vital, uma vez que a sensação de dor é fundamental para sobrevivência. A avaliação da dor inclui: localização, intensidade baseada em escala (numérica, verbal ou outras), momento do início, duração, padrão, fatores de alívio e agravantes, bem como os seus efeitos nas atividades diárias e na qualidade de vida em humanos. Devido a interferência na qualidade de vida e bem-estar a JCAHO estabeleceu a obrigatoriedade de avaliação, intervenção e reavaliação da dor no processo de qualificação ou acreditação hospitalar (MORETE; MINSON, 2010). Em geral, nos animais a dor só é tratada quando o médico veterinário e o responsável pelo animal reconhecem a sua presença e julgam a sua gravidade. Devidos aos avanços na compreensão e no tratamento da dor em animais, o que, felizmente veio a desmistificar conceitos atrasados de que os animais não sentiam dor, sobretudo a partir de 1998, quando o Colégio Americano de Anestesiologistas Veterinários (ACVA- *American College of Veterinary Anesthesiologists*) publicou a sua posição em relação a dor, considerando-a, condição importante no prejuízo à qualidade de vida e determinando a obrigatoriedade de sua prevenção e tratamento (TRINDADE; BATISTA; SILVA, 2013).

A avaliação da dor em humanos adultos responsivos é bastante complexa. Em pequenos roedores, a dor e o distresse; que é uma resposta do animal aos estímulos que interferem em seu bem-estar e conforto; não são facilmente avaliados e, portanto, todos os pesquisadores devem considerar que animais sentem dor de forma similar a humanos, a não ser que haja evidência científica do contrário (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2016). Darwin, em 1859, com seus estudos da ancestralidade comum entre várias espécies através da obra “A Origem das espécies”, deu suporte para a extrapolação de resultados obtidos em animais para seres humanos (REGIS; CORNELLI, 2012). O antropomorfismo não é visto como a melhor forma de lidar com essa questão devido à grande diferença entre a espécie humana e as espécies animais. Porém, a analogia é citada como bom guia para reconhecer a dor em animais. Há similaridade nos estímulos que causam dor nas diferentes espécies, podendo, por assim dizer, que existe similaridade do limiar de dor para estímulos químico, mecânicos e térmicos. A grande variação entre as espécies seria na expressão comportamental reativa frente ao estímulo doloroso (LUNA, 2008). Seguindo a teoria do antropomorfismo, pode-se relacionar os neonatos de camundongos com os neonatos humanos ou neonatos prematuros humanos, levando-se em conta a dificuldade de médicos e veterinários em avaliar a dor. É preciso considerar que um recém-nascido prematuro (RNPT) humano é capaz de sentir dor; precisa-se desconstruir a cultura de que a falta de mielinização seja um indicador de imaturidade do sistema nervoso central. Sugerindo que este não é capaz de sentir o processo doloroso. E com isso, implementar cuidados para avaliação deste desconforto, estresse ou dor gerados pelas diversas manipulações que sofrem na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). É relato comum das equipes de enfermagem que a avaliação da dor, é feita, principalmente, observando mudanças no comportamento da criança, incluindo choro característico, alterações na mímica facial, no humor e nos movimentos corporais. Os parâmetros fisiológicos também são usados para o reconhecimento da algia no neonato. Dentre eles, podemos citar o aumento da frequência respiratória, da frequência cardíaca, da saturação do oxigênio, da pressão arterial, da pressão intracraniana, a sudorese palmar e o tônus vagal (ALMEIDA, 2005; SANTOS; RIBEIRO; SANTANA, 2012).

Até a década de 80, afirmava-se que a imaturidade do sistema nervoso central (SNC), a ausência de memória para dor e a falta de mielinização protegiam os recém-nascidos humanos. Este último fator significa apenas uma condução mais lenta dos impulsos dolorosos, o que se compensa pela pequena distância interneural e neuromuscular percorrida pelo impulso nervoso. Além disso, como no adulto, os impulsos dolorosos são transmitidos por fibras não mielinizadas (polimodais C) ou pouco mielinizadas (A-delta). Um bebê já possui todos os componentes

necessários à percepção do estímulo doloroso desde o período pré-natal, intensificando-se num período compreendido entre o nascimento e as quatro primeiras semanas de vida. Um estudo sobre a fisiologia da dor em lactentes e crianças, baseou-se em lactentes humanos e filhotes recém-nascidos de ratos devido à semelhança das vias e mecanismos da dor nas duas espécies. Observou-se que a maturidade neurológica do rato neonato corresponde à do pré-termo na 24^a semana de gestação. Assim, notou-se que os influxos que se originaram dos receptores sensoriais cutâneos foram registrados pelos neurônios do corno posterior da medula espinal, nos fetos de ratos em fase tardia da gestação. As frequências desencadeadoras e os modos de respostas encontravam-se, de acordo com os registros, completamente maduros ao nascimento. Nesse contexto, a dor dos neonatos se torna um fenômeno à parte, uma vez que não podem verbalizá-la. Todavia, isso não quer dizer que não possam senti-la, mas que a expressam de forma peculiar. Assim, pode-se afirmar que os recém-nascidos não só sentem dor, como tem maior sensibilidade, sentindo-a por mais tempo (ALMEIDA, 2005; SANTOS; RIBEIRO; SANTANA, 2012).

A tolerância neonatal à hipóxia é uma peculiaridade fisiológica. Fetos de mamíferos vivem dentro do útero em pressões parciais de oxigênio correspondentes a 8000 metros de altitude (essa condição é referida como “*Everest in Utero*”). A linha de defesa da hipóxia perinatal consiste em adaptações de longo prazo para o limitado fluxo de oxigênio intrauterino. Essas adaptações básicas são: a) melhor transporte de oxigênio através da policitemia, aumentando a capacidade de ligação ao oxigênio, e um desvio para a esquerda da curva de dissociação da hemoglobina, aumentando a afinidade do oxigênio pelo sangue; b) taxa metabólica reduzida, como nos animais em hibernação; c) diminuição da vulnerabilidade cerebral por analogia funcional ao cérebro das tartarugas que mergulham; d) ganho metabólico flexível, por ser opcional a divisão energética entre crescimento e o metabolismo de manutenção. No caso da hipóxia neonatal, esses mecanismos básicos citados acima são complementados por respostas de curto prazo, como: 1) redução da temperatura corporal, como em torpor natural; 2) redução da frequência cardíaca e redistribuição da circulação, como nos mamíferos mergulhadores; 3) redução da frequência respiratória típica do hipometabolismo hipóxico; 4) redução do pH sanguíneo, melhoria do metabolismo anaeróbico (“Paradoxo do Lactato”), redução das demandas metabólicas e excreção prolongada de metabólitos ácidos (SINGER, 1999). O lactato que poderia indicar uma alta utilização da via anaeróbica é encontrado em nível bastante reduzido, esse é o fenômeno “Paradoxo Lactato”. A explicação para isso seria que em grandes altitudes a capacidade de tamponamento seria reduzido (FARIA *et al.*, 2005). Entre tantas peculiaridades relacionadas aos neonatos, ainda há a característica de pulmões cheios de alvéolos imaturos que contém pouca elastina, o que os torna rígidos e difíceis de inflar.

Esta combinação de parede torácica flexível com pulmões rígidos aumenta o volume do fechamento pulmonar e promove o colapso pulmonar (MARTIN, 2017).

Infelizmente, definir quando um animal se torna inconsciente (isto é, passa do estágio I para o estágio II da anestesia) não é uma tarefa simples. Inconsciência em animais tem sido historicamente definida como uma perda do reflexo de endireitamento ou LORR (*loss of the righting reflex*) (BOIVIN *et al.*, 2017). Em humanos, o início da inconsciência induzida pelo anestésico foi funcionalmente definido pela perda de resposta apropriada ao comando verbal; em animais, pela perda do reflexo de endireitamento (AVMA, 2020). Na LORR, os camundongos são virados em decúbito dorsal por 15-30 segundos até que não sejam mais capazes de se desvirar. Já a LOPR (*loss of the pedal withdrawal reflex*) que seria a perda do reflexo de retirada da pata ou cauda, é a perda do reflexo a dor profunda, usada como medida para a tolerância cirúrgica. O uso da parada respiratória é a forma mais confiável de medir o TTD (*time to death*) porque, em vários casos, os registros de ECG (eletrocardiograma) são perdidos devido a sinais fracos antes da parada cardíaca em camundongos muito pequenos. O TTD nada mais é que a contagem de 2 minutos após a constatação da apneia (DYER; BRICE; MARX, 2017; MARQUARDT *et al.*, 2018).

É importante notar que o tempo da inconsciência até a morte não afeta o bem-estar animal; como enfatizado, as preocupações com o bem-estar cessam quando o animal se torna inconsciente. No entanto, pode haver sérios problemas de bem-estar, se a má técnica resultar em alguns animais recuperando a consciência antes que um método secundário tenha sido feito (HAWKINS *et al.*, 2016).

Apesar de décadas de pesquisa nesta área, o conceito de estresse animal ainda continua indefinido. Observa-se que a capacidade de definir e medir o estresse imposto aos animais proporciona uma ferramenta para entender e prevenir as causas que alteram o bem-estar geral. O fenômeno é usualmente vinculado a uma profunda alteração fisiológica associada a um processo de doença ou alteração ambiental. Para alguns pesquisadores o estresse é uma situação extrema e indesejável enquanto outros consideram um parâmetro normal, transitório e desejável, já que representa uma reação de adaptação do organismo frente a uma nova situação (FLAJBAT; AMARAL; RIVERA, 2008).

O estresse é comumente definido na medicina humana como uma condição ou estado em que a homeostase do organismo é perturbada, como resultado de estímulos estressantes. Existem eventos diversos envolvendo a participação de diferentes sistemas do organismo em resposta a agentes estressores, como fatores climáticos, superpopulação, infecções, exercício físico intenso,

desnutrição, ruído, odor, entre muitos outros. O estresse é uma resposta adaptativa fundamental à sobrevivência, presente não só em mamíferos, como também em outros vertebrados, e os mecanismos básicos e as moléculas envolvidas na resposta ao estresse são similares e bem preservados ao longo da evolução das espécies (PAGLIARONE; SFORCIN, 2009).

O estresse e suas respostas resultantes foram divididas em três fases. O *Eustress* é o resultado estressante quando estímulos inofensivos iniciam respostas adaptativas que são benéficas para o animal. O *Neutral stress* ocorre quando a resposta do animal a estímulos não causa efeitos nem prejudiciais nem benéficos ao próprio. O *Distress* ocorre quando a resposta de um animal aos estímulos interfere em seu bem-estar e conforto. Para evitar o distresse, os veterinários devem se esforçar para sacrificar os animais nas suas zonas de conforto físico e comportamental (por exemplo: temperaturas preferidas, habitat natural, gaiolas) e, quando possível, preparar um ambiente calmo (AVMA, 2020).

4.6 Contaminação ambiental por anestésicos voláteis e exposição ocupacional

Ao término da década de 70, quando as primeiras pesquisas na área da saúde ocupacional foram desenvolvidas, concluiu-se que, em 50% dos casos de reclamações ou doenças ocupacionais com diferentes sintomas em prédios comerciais e edifícios públicos eram em decorrência de ventilação inadequada. Esta constatação foi baseada em medidas de níveis de CO₂ que excederam 1000 ppm (partes por milhão). Os problemas mais comuns associados à ventilação inadequada incluem: insuficiente entrada de ar externo nos edifícios; má distribuição e mistura do ar interno; extremos ou flutuações de temperatura e umidade; problemas de filtração de ar causados por manutenção inadequada ou imprópria dos sistemas de ventilação/refrigeração. O principal objetivo da ventilação mecânica é oferecer um ambiente interno saudável e confortável, além do controle da temperatura e da umidade. Na última década, entre os ocupantes de grandes prédios comerciais e edifícios públicos, tem sido comum a constatação de diferentes sintomas ocupacionais. Desde então, profissionais do *National Institute of Occupational Safety and Health* (NIOSH), órgão americano de controle da saúde ocupacional, vêm estudando esses sintomas que incluem dor de cabeça, irritação nos olhos, nariz ou garganta, tontura, náusea, fadiga e dificuldade de concentração, sendo o conjunto deles atualmente conhecido como “Síndrome do Edifício Doente” (SED). O CO₂ pode ser considerado como um dos causadores dos sintomas da SED, pois a exposição ao dióxido de carbono pode causar náusea, tontura e dor de cabeça. A exposição prolongada a baixas ou médias concentrações deste gás chega a causar estimulação respiratória e a afetar a regularidade da circulação sanguínea, e a exposição a altas concentrações pode causar

aumento da taxa de respiração e do batimento cardíaco, levando ao cansaço. Outras causas da SED podem ser apontadas, dentre elas, a exposição a altas concentrações de compostos orgânicos voláteis (COV) empregados como anestésicos inalatórios nas cirurgias, bem como a fatores psicossociais que incluem relações empregado-patrão e estresse. A utilização de compostos orgânicos voláteis, como os anestésicos, é uma prática rotineira em centros médicos. O procedimento para análise implica na coleta do ar ambiente, por exemplo, através de seringas plásticas e estas devem ser levadas imediatamente ao laboratório para análise. A determinação dos compostos orgânicos voláteis foi feita por cromatografia gasosa (ALMEIDA *et al.*, 1999; LUCIO *et al.*, 2018).

Os Resíduos de Gases Anestésicos (RGA) presentes no ar ambiente das Salas de Operação (SO) são associados a riscos ocupacionais diversos. Os efeitos para a saúde podem estar associados ao tipo de exposição: aguda ou crônica. Alguns destes efeitos adversos podem ser fadiga, irritabilidade, cefaleias, alterações hepáticas, renais, hematopoiéticas e ainda alterações neurocomportamentais. A exposição ocupacional a gases anestésicos nos profissionais dos blocos operatórios pode estar associada a dano genotóxico (PEREA *et al.*, 2018). Os RGA são capazes de induzir danos no material genético, como danos no DNA, avaliados pelo teste do cometa e aumento na frequência de micronúcleos em profissionais com exposição prolongada. O estresse oxidativo também é associado à exposição aos RGA por induzir lipoperoxidação, danos oxidativos no DNA e comprometimento do sistema antioxidante em profissionais expostos. O NIOSH recomenda o valor de 2ppm como limite de exposição ocupacional aos anestésicos inalatórios halogenados. Algumas causas de contaminação ambiental são: vazamentos nas estações de anestesia, falha no desligamento das válvulas de controle de fluxo, uso de alto fluxo de gases frescos ($\geq 3\text{L}/\text{min}$), etc (LUCIO *et al.*, 2018).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais, condições de alojamento, manejo e licença

Foram utilizados 70 camundongos *Swiss Webster*, neonatos com 7 dias de vida (Figura 1). Os animais utilizados foram oriundos do descarte zootécnico de neonatos da criação do Setor Convencional do SCRL/ICTB, especificamente da colônia de produção de fêmeas grávidas, onde as fêmeas são criadas em duplas e mantidas em mini isoladores medindo 21 cm altura x 32 cm comprimento x 20 cm largura em racks ventilados (Alesco®) e para tal utilizou-se as Licenças da CEUA/FIOCRUZ LW 13/15 e LW 54/19 outorgadas para o SCRL/ICTB. Os animais criados no SCRL/ICTB recebem ração peletizada autoclavada para a espécie (CR1-Quimtia-Nuvilab®-Brasil) e água autoclavada *ad libitum*, maravalha como forração da gaiola, mantidos sob temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade entre 50-60%.

Figura 1- Neonato de camundongo *Swiss Webster* de 7 dias



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Todos os animais utilizados eram fornecidos a partir do descarte zootécnico efetuado nos dias do experimento, de forma aleatorizada, sem exigência de sexo e realizada por técnico de manejo responsável pela sala de produção de camundongos *Swiss Webster* do SCRL/ICTB. Assim que os animais chegavam à sala de eutanásia, os procedimentos eram realizados, todos em mesmo horário matutino. Todos os animais receberam numeração aleatória para anotação dos dados de parâmetros observados em planilha e foram divididos em 2 grupos: Grupo Gaze (n= 36) e Grupo Aparelho (n= 34).

Os procedimentos de eutanásia foram realizados na sala de eutanásia do SCRL/ICTB, que permanecia com temperatura média de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e faixa de umidade 50-60%, não havendo sistema

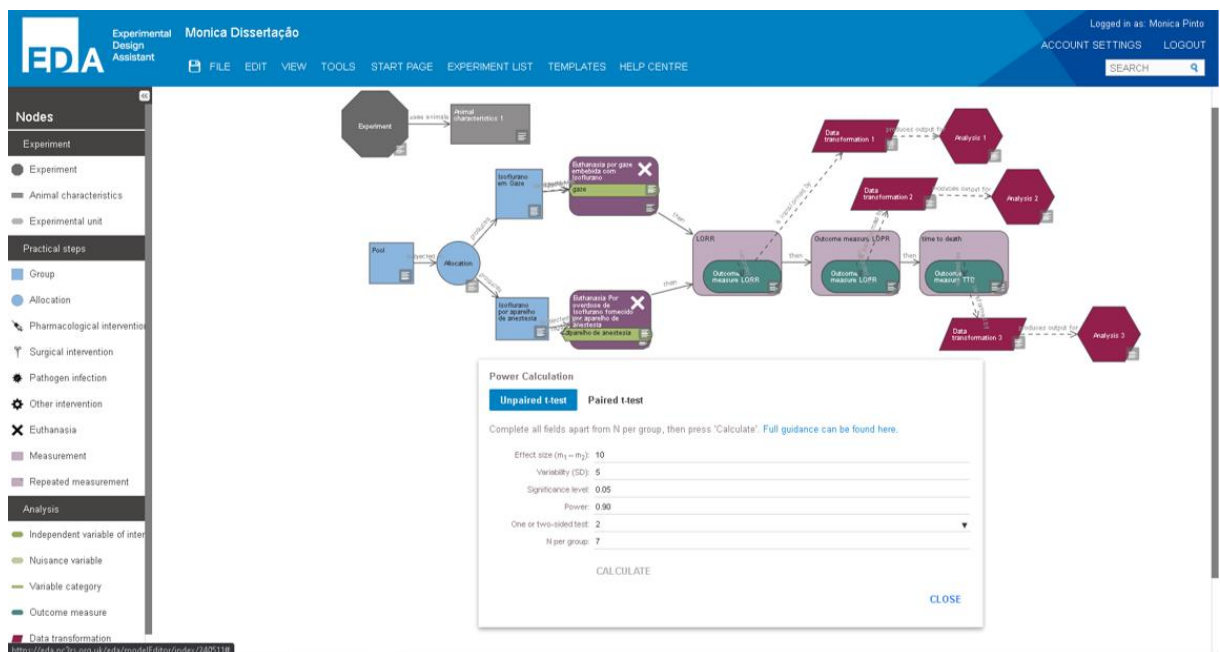
de exaustão. A Fiocruz encontra-se localizada na cidade do Rio de Janeiro, que apresenta pressão atmosférica de 760mmHg ou 1 atm (nível do mar).

5.2 Desenho Experimental

O desenho experimental do estudo foi realizado no software EDA® (*Experimental Design Assistant*) fornecido em acesso on-line e livre pelo NC3Rs (*National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research*) (Figura 2).

Segundo o cálculo amostral realizado no EDA®, o número mínimo de animais a serem utilizados para gerar resultados confiáveis seria $n=7$ por grupo (Figura 2). Também foi realizada consulta à equipe de pesquisadores em estatística do Programa de Computação Científica (PROCC) da Fiocruz, que recomendaram em sessão clínica um número máximo de 80 e mínimo de 60 neonatos para se obter representatividade amostral da população de neonatos descartados periodicamente no SCRL/ICTB.

Figura 2- Imagem do desenho experimental do estudo realizado no software livre EDA®



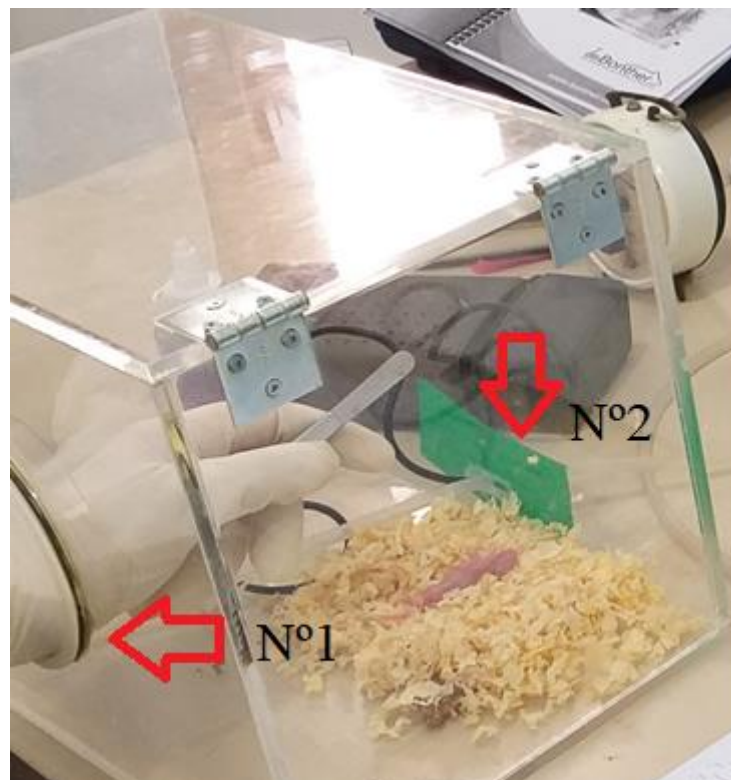
Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

5.3 Métodos de eutanásia e parâmetros aferidos

Uma câmara em acrílico cristal para eutanásia foi confeccionada para o experimento com as seguintes características: 6 mm de espessura, 21 cm altura x 32 cm comprimento x 20 cm largura, fechamento através de trava, 2 aberturas (uma em cada lateral) (Figura 3). Na maior abertura, com 9,5 cm de diâmetro, foi acoplada uma luva cirúrgica permitindo a colocação de uma das mãos

dentro da câmara (Figura 3-1). A outra abertura contralateral menor (medindo 3,2 cm de comprimento x 1,0cm de altura) permitia a passagem da mangueira de silicone do aparelho de anestesia para fornecimento do isoflurano vaporizado e do transdutor (10MHz) tipo “pastilha” do *doppler* vascular (DV 610 Medmega ®) (Figura 3-2). Após passagem da mangueira que traz o isoflurano do vaporizador universal e/ou do transdutor do *doppler*, a abertura era vedada com sobreposição de fita adesiva de demarcação de solo 50 mm (3M®).

Figura 3- Câmara de eutanásia confeccionada para o experimento e respectivas aberturas



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Para ambos os grupos, durante a realização dos procedimentos dentro da câmara, havia um tubo com gel condutor incolor para aumentar o contato do transdutor do *doppler* vascular com a pele do neonato para constatação da parada cardíaca e uma pinça anatômica para realização do pinçamento da pata e cauda para verificação de LOPR.

O isoflurano utilizado era da marca Isoforine® (Cristália - apresentação 240mL-1mg/mL) (R\$189,50/frasco).

GRUPO GAZE

Grupo composto por 36 neonatos, sendo eutanasiados individualmente. Foi utilizado 1 pedaço de gaze hidrófila 13 fios pesando 4 gramas e embebida com 10mL de isoflurano (Isoforine®

Cristália) / neonato dentro da câmara. O neonato foi colocado dentro da câmara previamente arrumada com maravalha, proveniente da mesma caixa em que o neonato foi transportado e, logo em seguida, foi colocada a gaze e os 10mL de isoflurano e iniciadas as tomadas de tempo com cronômetro (LORR, LOPR e parada cardíaca). Após a constatação da parada cardíaca através do *doppler* (Figura 4), o neonato era retirado do contato com o isoflurano e colocado em ar ambiente por pelo menos 10 minutos para que se observasse um possível retorno dos batimentos cardíacos, como preconiza a RN 37 do Concea. Após o tempo decorrido, era então realizada nova avaliação com o *doppler* para confirmação da parada cardíaca.

Figura 4-Método de eutanásia utilizado para o Grupo Gaze



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

GRUPO APARELHO

Grupo composto por 34 neonatos, sendo eutanasiados individualmente. Cada neonato foi colocado dentro da câmara previamente arrumada com maravalha proveniente da mesma caixa em que o neonato foi transportado. Foi utilizado aparelho de anestesia (sistema de anestesia inalatória digital Bonther®) com vaporizador universal para fornecimento do isoflurano (Figuras 5 e 6). Este obedeceu a configuração de fluxo de oxigênio em 5L/min e vaporizador totalmente aberto. O aparelho citado conta com monitoramento digital de saída de anestésico, com cálculo automático. Com esta programação o percentual do isoflurano calculado pelo aparelho ficou entre 25 e 27%. Foi iniciada a vaporização do isoflurano e feitas as tomadas de tempo com cronômetro (LORR, LOPR e parada cardíaca). Após a constatação da parada cardíaca através do *doppler*, o neonato era

retirado do contato com o isoflurano e colocado em ar ambiente por pelo menos 10 minutos para que se observasse um possível retorno dos batimentos cardíacos como preconiza a RN 37 do Conceca. Após o tempo decorrido, era então realizada nova avaliação com o *doppler* para confirmação da parada cardíaca.

Como no Grupo Gaze, o neonato que obteve maior tempo até a parada cardíaca apresentou 34 minutos (2040 segundos) até o óbito, foi feita a extrapolação desse valor para 40 minutos (2400 segundos), sendo este utilizado como tempo de corte/interrupção no tempo para exposição ao isoflurano do Grupo Aparelho. Esse tempo máximo estipulado teve como critério uniformizar o tempo máximo de exposição ao isoflurano necessário para comparação entre grupos.

Quando os neonatos não obtinham a parada cardíaca em até 40 minutos (2400 segundos) expostos ao isoflurano oferecido pelo vaporizador universal, estes eram retirados da câmara e colocados em outra câmara com gaze embebida com 10mL de isoflurano até constatação da parada cardíaca. Após, eram realizados os mesmos procedimentos pós-constatação da parada cardíaca realizados no Grupo Gaze.

Figura 5 - Método de eutanásia utilizado para o Grupo Aparelho



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Figura 6 - Aparelho de anestesia inalatória digital Bonther® utilizado no experimento para o Grupo Aparelho



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Foram avaliados os tempos dos seguintes parâmetros para ambos os grupos:

- Inconsciência (LORR): após início da inalação do anestésico, assim que o neonato parava de andar pela caixa, este era colocado em decúbito dorsal. Então era avaliado se este havia perdido o reflexo de endireitamento, se ele não fazia menção em retornar ao decúbito esternal (Figura 7).

Figura 7 - Avaliação de LORR em neonato de camundongo



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

- LOPR: Após a inconsciência iniciava-se o pinçamento seriado da pata e da cauda, até o momento em que o neonato não esboçava mais nenhuma reação (Figura 8).

Figura 8 - Avaliação de LOPR em neonato de camundongo



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

- Parada Cardíaca: constatação feita com o *doppler* vascular (DV 610 Medmega ®) após a perda do reflexo de retirada de pata e cauda. Utilizava-se gel condutor para ultrassom a fim de aumentar o contato do transdutor (10mHz) com a região torácica (*ictus cordis*) do neonato. Ao não se ouvir mais os batimentos cardíacos por pelo menos 2 minutos era determinado o tempo da parada cardíaca (Figura 9).

Em todas as avaliações a operadora da eutanásia estava sentada com o rosto à altura da caixa sobreposta em mesa de procedimentos.

Figura 9 - Avaliação com doppler vascular até parada cardíaca



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

5.4 Análise de gases voláteis no ambiente e na câmara de eutanásia

Foi realizada a análise das concentrações de isoflurano existentes no ambiente de eutanásia e no interior da câmara de eutanásia, utilizando-se os monitores de gases InfraRan 2® (Wilks Enterprises - EUA) e Vamos Plus® (Dräger - Alemanha).

Estas mensurações foram realizadas na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Universidade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus Botucatu.

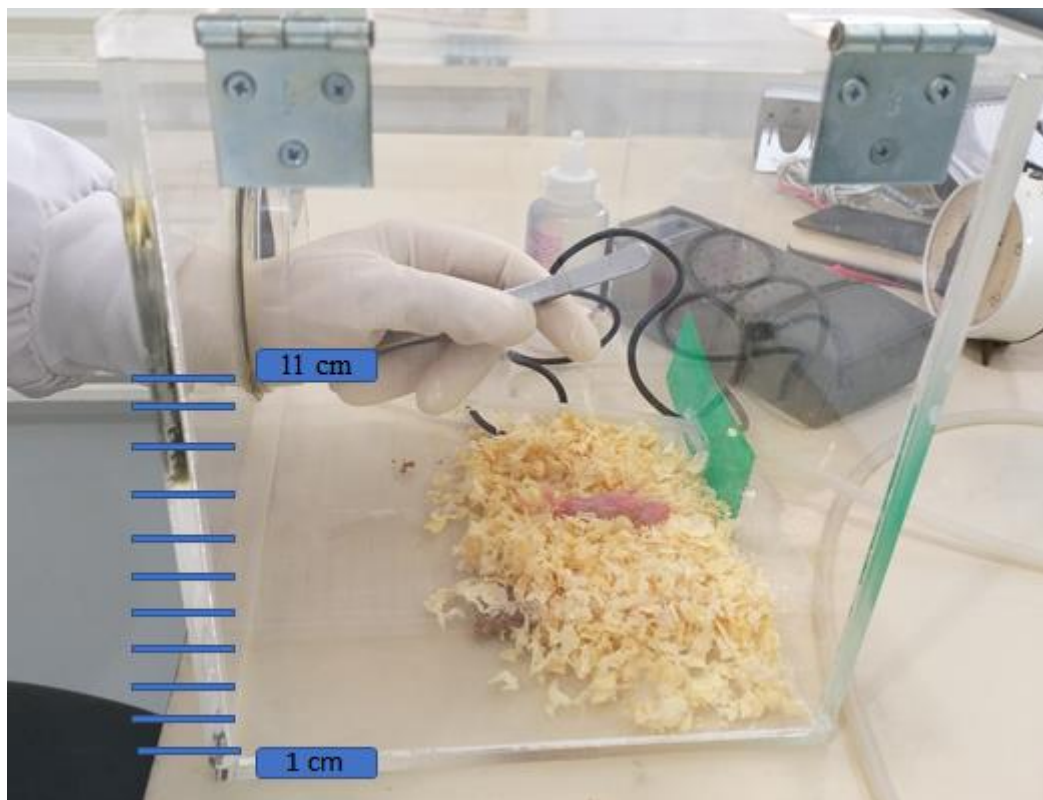
Figura 10 - Monitor de agentes anestésicos *Vamos Plus*® (Wilks Enterprises – EUA)



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

O Vamos Plus® (Figura 10) é um monitor para agentes anestésicos para uso em pacientes adultos, pediátricos e neonatais. A medição e exibição das concentrações dos agentes anestésicos voláteis na mistura de gás respiratório permitem uma monitorização mais eficaz do paciente. A mensuração de isoflurano é feita na faixa de 0 a 8,5%. Durante as mensurações o aparelho registrou concentrações de até 11,1% de isoflurano, após não acontecia mais leitura. As aferições com o Vamos Plus® foram realizadas em pontos específicos da câmara de eutanásia no Grupo Gaze, nas seguintes posições: 11cm (metade da altura da câmara de eutanásia), 10cm, 9cm, 8cm, 7cm, 6cm, 5cm, 4cm, 3cm, 2cm e 1cm (piso da câmara) (Figura 11).

Figura 11 - Pontos de mensuração da concentração de isoflurano (%) dentro da câmara de eutanásia com o *Vamos Plus*®



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

O InfraRan 2® (Figura 12) é um analisador de gases ambientais e foi utilizado para mensurar as concentrações residuais do isoflurano no ambiente. O analisador detecta as concentrações anestésicas em tempo real por infravermelho e o limite de detecção do equipamento varia de 0 a 50 ppm (partícula por milhão) para os anestésicos halogenados. As mensurações feitas com o InfraRan 2®, foram realizadas na altura da face do operador. As mensurações foram feitas da mesma forma para ambos os métodos (Figura 13).

Figura 12 - Analisador de gases ambientais *InfraRan 2*® (Dräger - Alemanha)



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Figura 13 - Ponto de mensuração da concentração de isoflurano (ppm) fora da câmara de eutanásia com o *InfraRan 2*®, próximo ao operador



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

5.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o teste estatístico ANOVA, com nível de significância das diferenças considerando $P \leq 0,05$. Os tempos para parada cardíaca superiores a 40 minutos foram padronizados em 2.400 segundos para efeito de cálculo. Já os valores obtidos com os custos do isoflurano com os dois métodos foram analisados comparando-se as médias com seus devidos desvios-padrões.

6 RESULTADOS

6.1 Resultados dos parâmetros aferidos e custos dos métodos

A média de LORR para o Grupo Gaze foi de 33,69 segundos ($\pm 7,93$ segundos), enquanto o LOPR obteve média de 339,61 segundos ($\pm 76,52$ segundos).

A média de tempo até a parada cardíaca foi de 923,05 segundos ($\pm 358,60$ segundos). 94,45% dos neonatos não retornaram seus batimentos cardíacos após os 10 minutos. Somente dois neonatos (5,55%) retornaram seus batimentos cardíacos durante este tempo fora da exposição ao isoflurano e precisaram ser reexpostos à inalação do gás anestésico.

A média do volume utilizado de isoflurano por neonato no Grupo Gaze foi de 10,55mL ($\pm 2,9$ mL), com custo médio de R\$8,33/animal ($\pm R\$1,80$). Os dados obtidos com a eutanásia dos animais do Grupo Gaze foram agrupados na Tabela 4.

Tabela 4- Valores de parâmetros observados, consumo e custos com isoflurano no Grupo Gaze/animal.

(continua)

Indivíduo	LORR (seg)	LOPR (seg)	Parada Cardíaca (seg)	Retorno após 10 minutos	Isoflurano consumido (mL)	Custos c/ Isoflurano (R\$)
18	35	370	719	Não	10	7,9
6	42	320	663	Não	10	7,9
31	46	239	530	Não	10	7,9
4	24	183	736	Não	10	7,9
19	27	277	452	Não	10	7,9
8	20	303	497	Não	10	7,9
13	21	348	498	Não	10	7,9
32	35	350	483	Não	10	7,9
1	38	223	628	Não	10	7,9
24	27	251	443	Não	10	7,9
36	41	260	680	Não	10	7,9
25	47	360	1105	Não	10	7,9
2	25	298	588	Não	10	7,9
11	31	350	764	Não	10	7,9

(conclusão)

Indivíduo	LORR (seg)	LOPR (seg)	Parada Cardíaca (seg)	Retorno após 10 minutos	Isoflurano consumido (mL)	Custos c/ Isoflurano (R\$)
34	35	350	590	Não	10	7,9
27	30	349	744	Não	10	7,9
9	26	327	715	Sim	20	15,8
28	25	323	1193	Não	10	7,9
30	20	337	1350	Não	10	7,9
3	46	265	990	Não	10	7,9
5	31	209	1096	Não	10	7,9
15	42	291	975	Não	10	7,9
21	27	358	1329	Sim	20	15,8
26	47	338	1590	Não	10	7,9
10	34	336	918	Não	10	7,9
17	32	429	791	Não	10	7,9
23	38	309	895	Não	10	7,9
33	48	358	1256	Não	10	7,9
7	34	370	1143	Não	10	7,9
12	26	347	1120	Não	10	7,9
14	33	445	830	Não	10	7,9
16	35	421	1095	Não	10	7,9
20	35	451	1363	Não	10	7,9
22	30	460	1180	Não	10	7,9
29	42	503	2073	Não	10	7,9
35	38	518	1208	Não	10	7,9

LORR= *loss of the righting reflex*; LOPR= *loss of the pedal withdrawal reflex*; seg= segundos; mL= mililitros; R\$= Real, moeda brasileira

Os dados obtidos com a eutanásia dos animais do Grupo Aparelho foram agrupados na Tabela 5.

Tabela 5- Valores de parâmetros observados, consumo e custos com isoflurano no Grupo Aparelho/animal.

(continua)

Indivíduo	LORR (seg)	LOPR (seg)	Parada Cardíaca (seg)	Retorno após 10 min	Isoflurano consumido (mL)*	Custos com Isoflurano (R\$)
3	49	174	>2400	Não	90	71,1
10	46	382	1320	Não	54	42.66
25	57	538	1140	Não	53	41.87
6	44	450	>2400	Não	95	75,05
15	36	474	>2400	Não	90	71,1
31	28	378	1388	Não	60	47.4
4	24	316	>2400	Não	90	71,1
13	44	736	>2400	Não	90	71,1
22	45	629	>2400	Não	90	71,1
1	23	274	>2400	Não	100	79
2	37	303	>2400	Não	90	71,1
29	39	348	1750	Não	65	51.35
36	51	826	>2400	Não	90	71,1
26	27	507	>2400	Não	90	71.1
8	47	537	>2400	Não	85	67.15
19	53	663	>2400	Não	90	71.1
5	11	544	1213	Não	65	51.35
11	28	666	1500	Não	60	47.4
35	28	644	>2400	Não	100	79
27	35	351	2321	Não	80	63.2
7	18	808	1442	Não	65	51.35
20	35	1058	1524	Não	60	47.4
21	32	1167	1751	Sim	70	55.3
16	37	1344	1695	Não	70	55.3
32	35	805	>2400	Não	100	79
12	37	675	>2400	Não	95	75.05
9	51	413	1105	Não	45	35.55
17	40	535	1149	Não	50	39.5
14	37	690	1834	Não	75	59.25

Indivíduo	LORR (seg)	LOPR (seg)	Parada Cardíaca (seg)	Retorno após 10 min	Isoflurano consumido (mL)*	Custos com Isoflurano (R\$)
18	65	290	>2400	Não	100	79
23	25	253	>2400	Não	85	67.15
28	35	545	>2400	Não	95	75.05
24	30	450	1795	Não	70	55.3
30	30	380	1159	Não	45	35.55

*esse valor corresponde ao total consumido pelo aparelho de anestesia e nos animais que retornaram o batimento cardíaco 10 minutos após ficarem fora do contato com o anestésico; aos 10mL utilizados na gaze da câmara hermética. LORR= *loss of the righting reflex*; LOPR= *loss of the pedal withdrawal reflex*; seg= segundos; mL= mililitros; R\$= Real, moeda brasileira.

A média de LORR para o Grupo Aparelho foi de 37,32 segundos ($\pm 11,80$ segundos), enquanto o LOPR obteve média de 563,32 segundos ($\pm 263,15$ segundos).

52,95% dos neonatos do Grupo Aparelho (18 neonatos) não apresentaram parada cardíaca dentro dos 40 minutos (2400 segundos) estipulados de corte. 47,05% dos neonatos (16 neonatos), vieram a óbito dentro dos 40 minutos (2400 segundos) estipulados de corte, destes 6,25% (1 neonato) retornaram os batimentos cardíacos após os 10 minutos sem contato com o isoflurano, sendo então colocado na câmara com gaze embebida com 10mL de isoflurano. O tempo médio para parada cardíaca deste grupo foi de 1979 segundos ($\pm 499,16$ segundos).

A média do volume utilizado de isoflurano por neonato no Grupo Aparelho foi de 75,05mL ($\pm 16,06$ mL) com custo médio de R\$59,29/animal ($\pm R\$12,68$).

A Tabela 6 mostra os valores de LORR, LOPR e parada cardíaca para os grupos Gaze e Aparelho.

Tabela 6- - Dados comparativos entre os grupos gaze e aparelho para avaliações de LORR, LOPR e parada cardíaca

Grupos	LORR	LOPR	Parada Cardíaca
Gaze	33,69 seg ($\pm 8,04$ seg)	339,61 seg ($\pm 76,52$ seg)	923,05 seg ($\pm 358,60$ seg)
Aparelho	37,32 seg ($\pm 11,80$ seg)	563,32 seg ($\pm 263,15$ seg)	1979 seg ($\pm 499,16$ seg)

LORR= *loss of the righting reflex*; LOPR= *loss of the pedal withdrawal reflex*; seg= segundos; mL= mililitros. LORR – $p < 0,01$. LOPR – $p < 0,01$.

Na análise estatística os valores de LORR não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($p = 0,1$), já para valores de LOPR e parada cardíaca houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$).

A comparação entre volumes de isoflurano gastos e custos entre os dois métodos está na Tabela 7. Foram demonstradas as médias e desvios-padrões.

Tabela 7- Dados comparativos entre os grupos gaze e aparelho para volume (mL) de isoflurano gasto e custo (R\$) de isoflurano por neonato

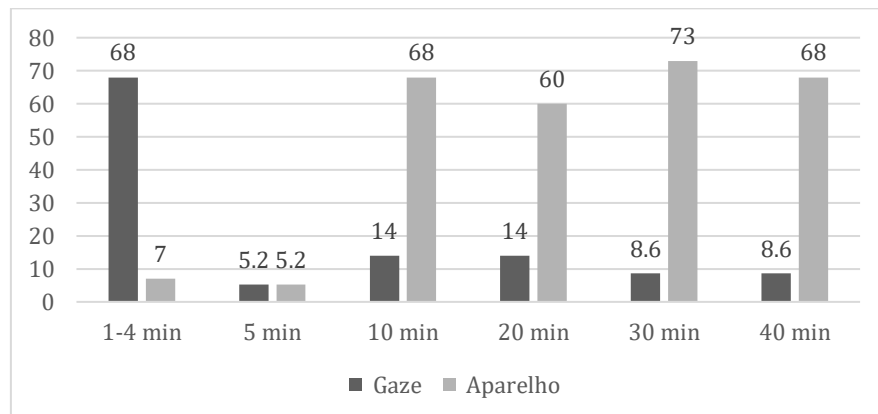
Grupos	Consumo de Isoflurano (mL)	Custo de Isoflurano (R\$)
Gaze	10,55 (\pm 2,90)	8,33(\pm 1,80)
Aparelho	75,05 (\pm 16,06)	59,29 (\pm 12,68)

mL= mililitros, R\$= moeda brasileira

6.2 Resultados das concentrações de isoflurano obtidas no interior e exterior da câmara de eutanásia

A Figura 14 mostra os resultados das mensurações feitas com o InfraRan 2® em relação ao operador em ambos os grupos. Os valores apresentaram diferença estatística significativas ($p > 0,01$). Já a Tabela 8 mostra os resultados das mensurações feitas com o Vamos Plus® nos tempos 20, 30 e 40 minutos de exposição ao isoflurano nos dois métodos.

Figura 14 - Gráfico demonstrativo de exposição do operador ao isoflurano (ppm) avaliado pelo InfraRan 2® nos dois métodos (Grupo Gaze e Grupo Aparelho) utilizados no experimento.



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Tabela 8- Concentração de isoflurano (%) no interior da câmara para o Grupo Gaze obtida pelo Vamos Plus®

PONTOS DE MENSURAÇÃO*	20 MINUTOS	30 MINUTOS	40 MINUTOS
11 cm**	4,5	4,8	4,8
10 cm	5,5	5,0	5,0
9 cm	-	5,8	5,8
8 cm	6,7	6,5	6,5
7 cm	7,1	6,8	6,8
6 cm	8	7,3	7,3
5 cm	8,8	7,4	7,4
4 cm	9,3	8,2	8,2
3 cm	10	8,6	8,6
2 cm	10,6	9,0	9,0
1 cm***	10,7	9,1	5,0

*Todas as mensurações foram feitas no lado da caixa onde a gaze foi colocada (acima da gaze). **11 cm é o meio da altura da câmara de eutanásia. ***1 cm é o fundo, o piso da câmara de eutanásia.

6.3 POP

A partir dos resultados deste trabalho foi realizada revisão no POP SCRL de Eutanásia de camundongos, o qual foi aprovado sob número 115/Revisão 01 (Apêndice).

7 DISCUSSÃO

Ao não serem encontradas diferenças significantes entre as médias obtidas para atingir a inconsciência (LORR) entre os animais dos grupos gaze e aparelho, demonstrou-se que valores inalados de isoflurano entre 27 e 33%, ou a forma de administração não diferem para que o animal comece a ficar inconsciente.

Já o tempo para perda do reflexo de dor profunda, ou seja, perda do reflexo de retirada de pata e cauda ao pinçamento (LOPR) nos camundongos neonatos teve diferença considerável entre os grupos, demonstrando que a ação do isoflurano difere na forma de sua administração. Este fato corrobora com a informação fornecida por Tranquilli, Thurmon e Grimm em 2007, onde estes relatam que o isoflurano fornecido sob forma de pressão de vapor saturado seria mais eficaz que em um vaporizador calibrado a 5%.

Os anestésicos produzem inconsciência impedindo a integração ou reduzindo as informações recebidas pelo córtex cerebral ou estruturas equivalentes. Dados entre espécies sugerem que a memória e a consciência são abolidas com menos da metade da concentração necessária para abolir movimento. Assim, um estado anestésico (inconsciência e amnésia) pode ser produzido em concentrações anestésicas que não impedem movimentos físicos (ALKIRE; HUDETZ; TONONI, 2008; ANTOGNINI; BARTER; CARSTENS, 2005;). Por isso LORR foi utilizado como parâmetro para inconsciência. Sabe-se que a concentração anestésica para produzir LORR é próxima a necessária para produzir inconsciência. Os resultados confirmam estes dados, primeiramente vimos a perda do reflexo de endireitamento (LORR) e após a perda do reflexo de dor profunda (LOPR).

O tempo levado até a parada cardíaca demonstrou diferença significativa entre os neonatos que receberam o isoflurano através do aparelho de anestesia, e aqueles que foram expostos ao isoflurano oferecido em gaze embebida, demonstrando que o Grupo Gaze é mais ético, pois atendeu as premissas da RN 37 do Concea no tocante a uma morte mais rápida.

O Grupo Gaze se mostrou mais econômico no tocante ao consumo (mL) e gasto (R\$) de isoflurano que o Grupo Aparelho.

Vale aqui a discussão sobre a necessidade do controle do número de animais de laboratório produzidos em instalações de criação. A necessidade de se propor métodos mais eficientes de eutanásia de neonatos de camundongos surgiu a partir da necessidade semanal de eutanásia de número considerável desses animais na rotina do SCRL/ICTB/Fiocruz,

mesmo que muitos desses animais excedentes sejam destinados à criações de animais silvestres para servirem de fonte de proteína na alimentação. A *LASA (Laboratory Animal Science Association)*, no Reino Unido, também discutiu os fatores que levam à superprodução de animais de laboratório em 1998. Três vezes mais de roedores eram produzidos à época para atender à demanda solicitada no Reino Unido e algumas causas foram apontadas nesse evento: incapacidade de combinar oferta com demanda; tentar atender à solicitação variável dos pesquisadores no que diz respeito à ampla gama de pesos corporais, idades variadas, sexo; grande número de cepas; animais portadores de patógenos que ocasionam risco potencial de ficarem clinicamente doentes e serem descartados; tempo de reprodução (como este não é um procedimento com tempo exato, mais animais do que o necessário podem ser produzidos para garantir a demanda); cancelamento de estudos; falta de racionalização e de colaboração entre instituições de pesquisas para compartilhamento dos excedentes produzidos, dentre outros fatores (*LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATION, 1998*).

A preocupação com a superprodução de animais também foi observada pelo *ILAR (Institute for Laboratory Animal Research)*, uma organização dos Estados Unidos que desenvolve e compartilha informações e diretrizes sobre testes em animais e cuidados com animais de laboratório, desde a década de 50. Ao observar que havia uma produção excessiva de animais de laboratório nos EUA, o *ILAR* criou um programa intitulado “Continuing Inventory of Commercial Laboratory Animal Stocks” que pretendia mapear as instituições/pesquisadores que necessitavam de exemplares destas espécies para seus estudos e assim criar redes para envio de excedentes a esses laboratórios/pesquisadores (*ILAR, 1957*).

A mesma iniciativa é necessária no Brasil para que possamos minimizar tal excedente de produção. Na realidade institucional, cabe um esforço coletivo envolvendo *CEUA*, pesquisadores e serviços de criação para que esses números sejam diminuídos e que consequentemente consigamos diminuir a necessidade de descartes zootécnicos. À *CEUA* cabe averiguar os reais motivos da produção de excedentes por parte das criações, a real necessidade por parte dos pesquisadores das demandas solicitadas no que diz respeito a sexo, idade, peso, linhagens e número de animais e propor um programa de controle da produção à instituição para cumprimento da legislação. Já aos pesquisadores deve ser esclarecido o processo de produção para que estes entendam que são responsáveis também pelo excedente produzido. A chave da minimização do número de excedentes produzidos é a informação e

a união de todos os envolvidos em prol da prerrogativa dos 3Rs. Com a realização dessa mobilização conjunta, será alcançada a redução do número de animais produzidos e refinamento de técnicas envolvidas.

A Diretiva da Comunidade Européia (Directiva/2010/63/EU) não cita explicitamente a utilização de anestésicos voláteis como método para eutanásia de roedores, mencionando somente a overdose anestésica sem especificação de apresentação (injetáveis ou inalatórios). O mesmo ocorre nos EUA, onde o *Guideline* da AVMA (2020) cita em linhas gerais que os anestésicos inalatórios são permitidos, as questões relacionadas a aversão e a não obtenção de uma inconsciência de forma imediata, observando ainda que, no tocante aos neonatos, os anestésicos inalatórios poderão ser usados de forma única com exposição prolongada ou associado a um segundo método. O estudo demonstrou que a exposição prolongada a anestésicos inalatórios é efetiva para a eutanásia de camundongos neonatos.

A utilização de anestésicos voláteis como método de eutanásia corrobora a produção de inconsciência rápida desejada dos métodos de eutanásia preconizado pelas normativas mundiais. Esses agentes agem causando inconsciência, impedindo a integração ou reduzindo as informações recebidas pelo córtex cerebral ou estruturas equivalentes (AVMA, 2020), atendem também a premissa da RN37 do Concea de não expor estes animais a agentes voláteis que somente gerem hipóxia.

Cabe o questionamento sobre a decapitação como método permitido com restrição de eutanásia a neonatos, tendo em vista que trabalhos realizados anteriormente com este método concluíram que pode ocorrer atividade elétrica cerebral através de EEG por até 30 segundos após a decapitação (AVMA, 2020; HOLSON, 1992). Tendo em vista a peculiaridade dos mecanismos da dor em neonatos, que estes são mais sensíveis a dor e a sentem por mais tempo (ALMEIDA, 2005; REGIS; CORNELLI, 2012; SANTOS; RIBEIRO; SANTANA, 2012), cabe rever os métodos de eutanásia, procedimentos invasivos, aplicações intraperitoneais e intracerebrais aos quais esses animais são submetidos.

O estudo aqui apresentado demonstrou que os tempos para inconsciência (LORR) nos dois grupos atendeu à inconsciência rápida desejada, tendo em vista que, os agentes barbitúricos aplicados pela via endovenosa são considerados o padrão ouro para a eutanásia de roedores, segundo a AVMA (2020) e a RN 37 do Concea, por causar inconsciência rápida. A rapidez da inconsciência produzida por barbitúricos pela via endovenosa deve-se a farmacodinâmica desta via, onde não há necessidade de absorção da medicação em questão.

É importante ressaltar que nosso estudo utilizou camundongos neonatos de 7 dias, sendo o acesso intravenoso inviável para administração de barbitúricos. A outra via permitida na legislação é via intraperitoneal, quando a endovenosa não é possível; nessa via há necessidade de absorção o que geraria uma inconsciência mais tardia, além da contenção do neonato e da injeção de uma substância potencialmente álgica dentro da cavidade abdominal. Portanto, a exposição prolongada a anestésicos inalatórios seria o mais indicado.

Os resultados obtidos com o Grupo Aparelho (uso do equipamento de anestesia inalatória) corroboram os resultados obtidos no estudo realizado por Seymour e Nagamine (2016), onde 23,7% do número total de neonatos (76) utilizados no estudo se recuperaram após a descontinuidade da exposição ao isoflurano durante 30 minutos e posterior exposição ao ar ambiente. O que nos leva a concluir que o uso do aparelho de anestesia inalatória recomendado para camundongos não o método mais eficiente para eutanásia de camundongos neonatos.

A realização da eutanásia em câmara fechada é permitida pela legislação (BRASIL, 2018) e pela AVMA em sua mais recente publicação (2020), embora esta última a indique como método a ser utilizado em estudos a campo.

As mensurações obtidas com o Vamos Plus® relacionadas aos percentuais de isoflurano dentro da câmara de eutanásia demonstrou a cinética de distribuição do isoflurano, mesmo não informando as concentrações reais de isoflurano por incapacidade do aparelho em avaliar acima dos percentuais máximos para inalação em procedimentos anestésicos. Os valores obtidos no Grupo Gaze permitem dizer que, quando utilizada a volatilização espontânea do isoflurano em condições já conhecidas (760mmHg e 20°C), este gás tem comportamento de gás pesado, ou seja, mantém-se com concentrações mais altas próximas ao piso da câmara. Esta observação quanto à cinética do gás pode nos ajudar a explicar os tempos de LOPR e parada cardíaca mais rápidos no Grupo Gaze. Afinal, a diferença das concentrações de isoflurano utilizadas foram pequenas (Grupo Gaze 33% e Grupo Aparelho 27%). Provavelmente, a volatilização espontânea (Grupo Gaze) gera uma concentração local maior de moléculas de isoflurano (próximo ao piso da câmara). Essa constatação sugere que um sistema de exaustão eficiente para uma sala de eutanásia ou centro cirúrgico, deverá levar em conta essa natureza densa do isoflurano, e isso indica que os ductos de exaustão que puxam o ar com os RGAs deverão ser instalados o mais baixo possível, preferencialmente logo

acima do piso. Além deste cuidado, recomenda-se também realizar o procedimento no interior de uma cabine de fluxo laminar apropriada para vapores químicos.

Uma questão importante de saúde do trabalhador deve ser observada na utilização de anestésicos inalatórios. A avaliação criteriosa, feita com auxílio dos professores de anesthesiologia humana da UNESP/Botucatu, demonstrou o quanto a contaminação do ambiente com resíduos de gases anestésicos (RGA) deve ser levada em consideração. Os valores de gases anestésicos halogenados obtidos com o sensor de gases InfraRan 2® demonstrou que houve contaminação ambiental nos dois métodos acima dos 2ppm preconizados por NIOSH como não tóxicos (LUCIO *et al.*, 2018). O Grupo Gaze demonstrou gerar uma menor contaminação ao longo do tempo, oferecendo menor risco de exposição ao operador/técnico (ALMEIDA *et al.*, 1999; LUCIO *et al.*, 2018; PEREA *et al.*, 2018). Com um sistema de exaustão adequado no ambiente de eutanásia o problema pode ser minimizado. Devido a essas questões, é importante que todas as pessoas que atuem como operadores na realização de eutanásia tenham seus nomes informados à instituição, para que de forma periódica sejam encaminhados aos serviços de saúde do trabalhador para avaliações psicológicas, clínicas e realização de exames complementares de rotina, toxicológicos e genotóxicos (LUCIO, BRAZ; 2018).

Os pontos limitantes deste trabalho são:

- A necessidade de utilização de um equipamento para confirmação do óbito (*doppler vascular*). Às instituições que não possuem equipamento para confirmação do óbito, a solicitação de autorização a CEUA para decapitação após a perda do reflexo de retirada pata/cauda (LOPR) seria uma alternativa;
- As dúvidas quanto às concentrações apresentadas no display de equipamentos de anestesia inalatória para roedores, como o utilizado neste estudo. Durante o trabalho tentamos contato com o fabricante solicitando os cálculos utilizados para obter essa informação, mas estes não foram enviados;
- A exposição do operador à contaminação ambiental por isoflurano. Conforme já mencionado, é possível diminuir a exposição ao gás durante o procedimento utilizando capela de fluxo laminar e instalação de sistema de exaustão adequado.
- A realização da eutanásia de forma individual. Para viabilização do estudo, a mensuração dos parâmetros (LORR, LOPR e parada cardíaca) e eutanásia foram realizadas de forma

individual para obtenção de análise estatística confiável. Na prática do SCRL/ICTB, a eutanásia de camundongos *Swiss Webster* neonatos é realizada em grupos de até 20 animais utilizando a mesma técnica do Grupo Gaze e obtém resultados eficientes em tempos similares ao deste estudo.

8 CONCLUSÃO

O Grupo Gaze, onde utilizou-se o isoflurano em gaze embebida dentro da câmara fechada para eutanásia, produziu uma inconsciência mais rápida (LORR), uma perda mais rápida do reflexo de retirada de pata/cauda (LOPR) e uma parada cardíaca mais rápida em relação ao Grupo Aparelho, onde utilizou-se o vaporizador universal para fornecimento do isoflurano. O Grupo Gaze também demonstrou ser um método mais econômico no que tange ao consumo (mL) e gasto (R\$) de isoflurano e ainda gerou uma menor contaminação ambiental.

REFERÊNCIAS

ALKIRE, M. T.; HUDETZ, A. G.; TONONI, G. Consciousness and anesthesia. **Science**, p. 876-880, 7 novembro. 2008. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2743249/> Acesso em: 5 jan. 2020.

ALMEIDA, F. V. et al. Contaminação Atmosférica num Centro Cirúrgico por. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 49, maio-junho 1999. 190-195. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/228604758_Contaminacao_atmosferica_num_centro_cirurgico_por_compostos_organicos_volateis_e_dioxido_de_carbono Acesso em: 22 fev. 2020.

ALMEIDA, P. C. Dor no recém-nascido. **Revista Pediatria Moderna**, 41, n. 3, jun. 2005. 118-126. Disponível em:

https://semanaacademica.org.br/system/files/artigos/dor_artigo_final.pdf Acesso em: 25 jun. 2018.

ANTOIGNINI, J. F.; BARTER, L.; CARSTENS, E. Overview: movement as an index of anesthetic depth in humans and experimental animals. **Comp Med**, v. 55, p. 413-418, 2005. Disponível em:

<https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/cm/2005/00000055/00000005/art00001%3bjesionid=1xesv4u4xmlts.x-ic-live-03> Acesso em: 5 jan. 2020.

ATALAC, B.; FATOVIC-FERENCIC, S. Emanuel Edward Klein: The father of British Microbiology and the case of the Animal Vivisection Controversy of 1875. **Toxicologic Pathology**, 37, 2009. 708-713. Disponível em:

<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623309345871> Acesso em: 23 jan. 2018.

AVMA. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. **American Veterinary Medical Association**, p. 121, jan. 2020. Disponível em: <https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/avma-guidelines-euthanasia-animals> Acesso em: 24 janeiro 2020.

BOIVIN, G. et al. Review of CO₂ as a Euthanasia Agent for Laboratory Rats and Mice. **J Am Assoc Lab Anim Sci.**, v. 56, n. 5, p. 491-499, SETEMBRO 2017. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5605172/> Acesso em: 25 set. 2019.

BOIVIN, G. P. et al. Physiologic, Behavioral, and Histologic Responses to Various Euthanasia Methods in C57BL/6NTac Male Mice. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 56, n. 1, p. 69-78, jan. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5250498/> Acesso em: 16 março 2019.

BRASIL. Decreto Nº16.590, de 10 de setembro de 1924. “**Aprova o regulamento das casas de diversões públicas**”, 10 setembro 1924. Disponível em:

<https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1920-1929/decreto-16590-10-setembro-1924-509350-publicacaooriginal-1-pe.html> Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL. Decreto Nº24.645, de 10 de julho de 1934. "**Estabelece medidas de proteção aos animais.**", 10 julho 1934. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/D24645.htm Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL. Decreto-Lei Nº3.688, de 03 de outubro de 1941. "**Lei das contravenções penais.**", 03 outubro 1941. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del3688.htm Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL. Lei Nº6.638, de 08 de maio de 1979. "**Estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais e determina outras coisas.**", 08 maio 1979. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/1970-1979/L6638.htm Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL. Decreto Nº11/91, de 29 de novembro de 1991. "**Torna sem efeito a revogação dos decretos que menciona.**", 29 novembro 1991. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/DNN/Anterior%20a%202000/Dnn6-29-11-91.htm Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL. Lei Nº9.605, de 12 de fevereiro de 1998. "**Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá providências.**", 12 fevereiro 1998. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9605.htm Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL. Lei Nº11.794, de 08 de outubro de 2008. "**Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico dos animais; revoga a Lei Nº6.638, de 08 de maio de 1979; e dá outras providências.**", 08 outubro 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL. Resolução Normativa Nº37. "**Baixa diretriz da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.**", 15 fevereiro 2018. Disponível em: http://www.mcti.gov.br/mcti/export/site/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/RN-37.pdf Acesso em: 10 jan. 2018.

BRUNSON, D. B. Pharmacology of Inalation Anesthetics. In: FISH, R. E., et al. **Anaesthesia and Analgesia in Laboratory Animals**. 2. ed. Nova York: Academic Press, 1997. Cap. 2, p. 29-41. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124175709500052> Acesso em: 18 set. 2019.

BUCHER, K.; BUCHER, K. E.; WALZ, D. Irritant actions of unphysiological pH values. A controlled procedure to test for topical irritancy. **Agents and Actions**, 9, 1979. 124-132.

CASTELLANOS-OLIVARES, A. et al. Profundidad Anestésica y Morbimortalidad Postoperatoria. **Revista Mexicana de Anestesiología - Anestesia en El Paciente Senil**, 37, n. 1, junio 2014. 108-112. Disponível em: <http://www.medigraphic.com/pdfs/rma/cma-2014/cmas141ae.pdf> Acesso em: 13 fev. 2019.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. Redução, Refinamento e Substituição do uso de Animais em Estudos Toxicológicos: Uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 40, n. 3, 2004. 289-299. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322004000300004&script=sci_abstract&ting=pt Acesso em: 23 jan. 2018.

CFMV. Resolução N°1000, de 11 de maio de 2012. "**Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia e dá outras providências.**", 11 maio 2012. Disponível em: <http://www.portel.cfmv.gov.br/lei/index/id/326> Acesso em: 10 jan. 2018.

CHISOLM, J. et al. Carbon dioxide, but not isoflurane, elicits ultrasonic vocalizations in female rats. **Laboratory Animals**, 4 julho 2013. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0023677213493410> Acesso em: 17 jun. 2019.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de Laboratório: O Camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, 28, n. 1, 2007. 11-23. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/70144> Acesso em: 09 mar. 2019.

CHORNEY, J. M.; KAIN, Z. N. Behavioral analysis of children's response to induction of Anaesthesia. **Anesth Analg**, 109, 2009. 1434-1440. Disponível em: https://journals.lww.com/anesthesia-analgesia/Fulltext/2009/11000/Behavioral_Analysis_of_Children_s_Response_to.17.aspx Acesso em: 08 dez. 2019.

DYER, C. S.; BRICE, A. K.; MARX, J. O. Intraperitoneal Administration of Ethanol as a Means of Euthanasia for Neonatal Mice (*Mus musculus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 56, n. 3, 2017. 299-306. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5438924> Acesso em: 23 jan. 2018.

EUA. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) 41-35-076. **Animal Welfare Act and Animal Welfare Regulation**, january 2017. Disponível em: https://www.aphis.usda.gov/animal_welfare/downloads/AC_BlueBook_AWA_FINAL_2017_508comp.pdf Acesso em: 10 jan. 2019.

FARIA, A. P. et al. Treinamento na Altitude. **Movimento & Percepção**, Espírito Santo de Pinhal, 5, n. 6, jun 2005. Disponível em: <http://ferramentas.unipinhal.edu.br/mvimentopercepcao/include/getdoc.php?id=155&article=43&mode=pdf> Acesso em: 23 jan. 2019.

FINN, M. A.; STARK, J. F. Medical Science and the Cruelty to Animals Act 1876: A re-examination of anti-vivisectionism in provincial Britain. **Stud Hist Philos Biol Biomed**

Sci, 49, 2015. 12-23. Disponível em: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25437634> Acesso em: 23 mar. 2018.

FLAJBAT, M.; AMARAL, V. L. L.; RIVERA, E. A. B. Ciência em Animais de Laboratório. **Ciência e Cultura**, São Paulo, 60, n. 2, 2008. Disponível em: [http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252008000200019&script=sci_arttext\\$ting=pt](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252008000200019&script=sci_arttext$ting=pt) Acesso em: 09 mar. 2019.

FLEKNELL, P. **Laboratory Animal Anaesthesia**. 3. ed. [S.l.]: Elsevier, 2009. 325 p. Acesso em: 1 dez. 2019.

FONSECA, N. M. et al. Anestesia com fluxo basal de gases (Quantitativa). **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 21, n. 4, p. 15-26, agosto/dezembro 2011. Disponível em: <http://rmmg.org/artigo/detalhes/812> Acesso em: 24 nov. 2019.

GRIER, R. L.; SCHAFFER, C. B. Evaluation of intraperitoneal and intrahepatic administration of a euthanasia agent in animal shelter cats. **Am Vet Med Assoc**, 197, n. 12, 1990. 1611-1615. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2276957/> Acesso em: 12 jun. 2020.

GUIMARÃES, M. V.; FREIRE, J. E. C.; MENEZES, L. M. B. Utilização de Animais em Pesquisa: Breve revisão da Legislação no Brasil. **Revista Bioética**, 24, n. 2, 2016. 217-227. Disponível em: http://revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista_bioetica/article/view/1010/1478 Acesso em: 10 ago. 2018.

HAWKINS, P. et al. A Good Death? Report of the Second Newcastle Meeting on Laboratory Animal Euthanasia. **Animals (Basel)**, v. 6, n. 9, p. 50, STEMBRO 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5035945/> Acesso em: 23 jan. 2018.

HODGSON, D. S. Anesthetic Concentrations in enclosed chamber using an innovative delivery device. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 34, p. 99-106, 2007.

HOLSON, R. R. Euthanasia by decapitation: Evidence that this Technique Produces Prompt, Painless unconsciousness in Laboratory Rodents. **Revista de Neurotoxicology and Teratology**, 14, n. 4, august 1992. 253-257. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/089203629290004T?via%3Dihub> Acesso em: 15 mar. 2019.

IASP – International Association for the Study of Pain Taxonomy. 2011. **Pain terms, a current list with definitions and notes on usage**. p. 209-214. 1994. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698> Acesso em: 10 fev. 2020.

ILAR. Information on Laboratory Animals for Research. **Information on Laboratory Animals for Research**, 1, n. 1, october 1957. 10. Disponível em:

https://books.google.com.br/books?id=oRJmhHu-Ys4C&pg=PP9&dq=Information+on+Laboratory+Animals+for+Research,+1957&hl=pt-BR&source=gbs_selected_pages&cad=2#v=onepage&q=Information%20on%20Laboratory%20Animals%20for%20Research%2C%201957&f=false Acesso em: 10 fev. 2020.

INTERAGENCY RESEARCH ANIMAL COMMITTEE. US government principles for utilization and care of vertebrate animals used in testing, research and training, 2015. Disponível em: <https://olaw.nih.gov/policies-laws/phs-policy.htm> Acesso em: jun. 2020.

KRAHN, C. L.; LIMBERGER, R. P.; GUTERRES, S. S. Isoflurano: desenvolvimento de um método analítico empregando microextração em fase sólida, incorporação em nano emulsões e avaliação biológica das nano emulsões. **Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências farmacêuticas - Universidade do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/60978> Acesso em: 22 fev. 2020.

LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATION. <http://www.lasa.co.uk/PDF/Surplus.pdf>. **Laboratory Animal Science Association**, 1998. Disponível em: <http://www.lasa.co.uk/PDF/Surplus.pdf> Acesso em: 22 fev. 2020.

LEACH, M. C. et al. Aversion to gaseous euthanasia agents in rats and mice. **Comp Med.**, v. 52, n. 3, p. 249-57, 3 Junho 2002. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/cm/2002/00000052/00000003/art00010#> Acesso em: 05 jan. 2020.

LEWBART, G. A. **Invertebrate medicine**. Oxford: Blackwell, 2006.

LIMA, W. T. Entendimento Humano da Experimentação Animal. **Ciência e Cultura**, São Paulo, 60, n. 2, 2008. 26-27. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252008000200013 Acesso em: 10 ago. 2018.

LUCIO, L. M. et al. Riscos ocupacionais, danos no material genético e estresse oxidativo frente à exposição aos resíduos de gases anestésicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 68, janeiro-fevereiro 2018. 33-41. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034709416303257> Acesso em: 22 fev. 2020.

LUNA, S. P. Dor, Senciência e Bem-estar em Animais. **Ciência Veterinária dos Trópicos**, Recife, 11, n. 1, abril 2008. 17-21. Disponível em: <http://revt.org.br/suplemeto11/17-21.pdf> Acesso em: 30 jan. 2018.

MARQUARDT, N. et al. Euthanasia of laboratory mice: Are isoflurane and sevoflurane real alternatives to carbon dioxide? **PLoS ONE**, setembro 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0203793> Acesso em: 16 mai. 2019.

- MARTIN, L. D. Princípios Básicos De La Anestesia Neonatal. **Revista Colombiana de Anestesiologia**, 45, n. 1, 2017. 54-61. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/pdf/rca/v45n1/45n1a10.pdf> Acesso em: 30 jan. 2018.
- MOODY, C. M.; CHUA, B.; WEARY, D. M. The effect of carbon dioxide flow rate on the euthanasia of laboratory mice. **Laboratory Animals**, 5 Agosto 2014. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0023677214546509> Acesso em: 17 jun. 2019.
- MORETE, M.C.; MINSON, F.P. Instrumentos para a avaliação da dor em pacientes oncológicos. **Revista Dor**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 74-80, 2010. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1806-0013/2010/v11n1/a1503.pdf> Acesso em: 10 jan 2020.
- NC3RS. The 3Rs. **NC3Rs**, 2019. Disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs> Acesso em: 15 mar. 2019.
- NOLEN, R. S. Veterinarian's Oath Revised to Emphasize Animal Welfare Commitment. **JAVMA News**, 01 january 2011. Disponível em: <https://www.avma.org/News/Pages/x110101a.aspx> Acesso em: 15 mar. 2019.
- PAGLIARONE, A. C.; SFORCIN, J. M. Estresse: Revisão sobre seus efeitos no sistema imunológico. **Bio saúde**, Londrina, 1, n. 1, junho 2009. 57-90. Disponível em: http://www.uel.br/ccb/patologia/portal/pages/arquivos/Biosaude%20v%2011%202009/BS_v11_n1_DF_57.pdf Acesso em: 11 mar. 2019.
- PAIVA, J. N. Considerações Sobre a Eutanásia na Medicina Veterinária. **Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília**, Brasília, 2016. 29. Disponível em: http://bdm.unb.br/bitstream/10483/16433/1/2016_JacquelineNeryDePaiva_tcc.pdf Acesso em: 10 abr. 2018.
- PARLAMENTO E CONSELHO EUROPEU. DIRECTIVA 2010/63/UE - relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos. **Jornal Oficial da União Europeia**, 2010. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN> Acesso em: 16 mai. 2018.
- PEREA, E. et al. Exposição Ocupacional a Gases Anestésicos no Centro Hospitalar Universitário. **Revista Portuguesa de Saúde Ocupacional On Line**, 6, 22 set. 2018. 1-12. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Pedro_Rosa18/publication/328420040_Exposicao_Ocupacional_a_Gases_Anestesicos_no_Centro_Hospitalar_Universitario_de_Lisboa_Central_EPE/links/5bcd90b092851cae21b8dbf4/Exposicao-Ocupacional-a-Gases-Anestesicos-no-Centro-H Acesso em: 22 fev. 2020.
- POWELL, K.; ETHUN, K.; TAYLOR, D. K. The effect of light level, CO2 flow rate, and anesthesia on the stress response of mice during CO2 euthanasia. **Laboratory Animal**, v. 45, p. 386-395, 2016. Acesso em: 16 mai. 2019.

RANG, H. P. et al. Agentes Anestésicos gerais. In: RANG, H. P., et al. **Rang & Dale: Farmacologia**. [S.l.]: Elsevier, 2016. Cap. 41, p. 1167-1190. ISBN 9788535265002. Acesso em: 10 mar. 2018.

REGIS, A. H. P.; CORNELLI, G. Experimentação Animal: Panorama Histórico e Perspectivas. **Revista Bioética**, 20, 2012. 242-243. Disponível em: http://revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista_bioetica/article/view/562/773 Acesso em: 10 jun. 2018.

ROSA, C. et al. Effects of exposure to halothane, isoflurane, and sevoflurane on embryo viability and gestation in female mice. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, 36, março 2015. 871-882. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/17939/16124> Acesso em: jun. 2019.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992. ISBN: 0900767782. Special Edition. Disponível em: <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique> Acesso em: 14 mai. 2019.

SANTOS, L. M.; RIBEIRO, I. S.; SANTANA, R. C. B. Identificação e Tratamento da dor no recém-nascido prematuro na Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, 65, n. 2, abril 2012. 269-275. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/reben/v65n2/v65n2a11.pdf> Acesso em: 25 jun. 2018.

SÃO PAULO. Resolução Nº127 de 07 de junho de 1886. **Código de Postura da Cidade de Silveiras**, 07 junho 1886. Disponível em: <http://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/resolucao/1886/resolucao/-127-07.06.1886.html> Acesso em: 10 jan. 2018.

SARAIVA, R. A. Mecanismo de Ação dos Anestésicos Inalatórios. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 52, n. 1, fevereiro 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rba/v52n1/v52n1a13.pdf> Acesso em: 25 jun. 2018.

SCHOELL, A. R. et al. Euthanasia Method for Mice in Rapid Time-Course Pulmonary Pharmacokinetic Studies. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, 48, 2009. 506-511. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2755020/> Acesso em: jun. 2020.

SENADO FEDERAL. **As Vidas dos Doze Césares - Caio Suetônio Tranquillus - Edições do Senado Federal**. Tradução de Senado federal. Brasília: [s.n.], v. 171, 2012. 320 p. Acesso em: 14 jun. 2020. Tradução de obra de Importância Mundial - As Vidas dos Doze Césares - Caio Suetônio Tranquillus - 69 d.C - 122 d.C.

SEYMOUR, T. L.; NAGAMINE, C. M. Evaluation of isoflurane overdose for euthanasia of neonatal mice. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, 55, n. 3, maio 2016. 321-323. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4865695/> Acesso em: 20 jan. 2019.

SHARP, J.; AZAR, T.; LAWSON, D. Comparison of Carbon Dioxide, Argon, and Nitrogen for inducing Unconsciousness or Euthanasia of Rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 45, March 2006. 21-25. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/jaalas/2006/00000045/00000002/art00003> Acesso em: dez. 2019.

SINGER, D. Neonatal Tolerance to Hypoxia: a comparative-physiological approach. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 123, n. 3, July 1999. 221-234. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501017> Acesso em: 25 fev. 2018.

SINGER, P. All Animals are Equal. **Philosophical Exchange** 1, n. 5, 1974. 103-116. Disponível em: <https://iseethics.files.wordpress.com/2013/02/singer-peter-all-animals-are-equal-original.pdf> Acesso em: 23 jan. 2018.

SIVULA, C. P.; SUCKOW, M. A. Chapter 35: Euthanasia. **Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education and Testing**, n. 2, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500441>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

STACHNIK, J. Inhaled anesthetic agents. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 63, n. 7, p. 623-634, 1 abril 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajhp/article-abstract/63/7/623/5135957> Acesso em: 5 ago. 2019.

STEFFEY, E. P.; MAMA, K. R. Inhalation Anesthetics. In: TRANQUILLI, W. J.; THURMON, J. C.; GRIMM, K. A. **Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia**. 4. ed. [S.l.]: Blackwell Publishing, 2007. Cap. 13, p. 373-394. Acesso em: 1 dez. 2019.

TANSEY, E. M. "The Queen Has Been Dreadfully Shocked": Aspects of teaching experimental physiology using animals Britain, 1876-1986. **AM. Physiol.** 274 (Adv. Educ. Physiol. 19), 1998. 18-33. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/advances.1998.274.6.S18> Acesso em: 14 jun. 2020.

THOMAS, A. A.; FLECKNELL, P. A.; GOLLEDGE, H. Combining Nitrous Oxide with Carbon Dioxide Decreases the Time to Loss of Consciousness during Euthanasia in Mice — Refinement of Animal Welfare? **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 12, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3305278/> Acesso em: 17 jun. 2019.

TRANQUILLI, W.J.; THURMON, J.C.; GRIMM, K.A. **Lumb and Jones' veterinary anesthesia and analgesia**. 4th ed. Ames (IA): Blackwell publishing.

TRINDADE, H. I.; BATISTA, M. C. S.; SILVA, L. L. B. Dor: Mecanismo envolvidos na sua transmissão e recursos terapêuticos aplicados à sua inibição. **Jornal da Universidade Rural de Pernambuco**, 2013. Disponível em: <http://www.journals.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article.viewFile/582/461> Acesso em: 05 jun. 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Guia de Anestesia para Ratos e Camundongos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. [S.l.]. 2016.

VENTICINQUE, S. G.; ANDREWS, J. J. Inhaled Anesthetics: Delivery Systems. In: MILLER, R. D. **Miller Anestesia**. 8. ed. [S.l.]: Elsevier, v. 1, 2018. Cap. 29, p. 752-826.

Disponível em:

<https://books.google.com.br/books?id=O0VwDwAAQBAJ&pg=PT1799&lpg=PT1799&dq=STEVEN+G.+VENTICINQUE+%E2%80%A2+J.+JEFFREY+ANDREWS&source=bl&ots=MTpdWjGPGt&sig=ACfU3U08POlsiuSTPdCwHNYg0cMR9E3dyw&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwi7iffAIJLnAhXtYN8KHQkSDiUQ6AEwAHoECAoQAQ#>

Acesso em: 1 dez. 2019.

WILKINS III, J. R.; BOWMAN, M. E. Needlestick injuries among female veterinarians: frequency, syringe contents and side-effects. **Occup Med (Lond)**, 47, 1997. 451-457.

Disponível em: [https://watermark.silverchair.com/47-8-](https://watermark.silverchair.com/47-8-451.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ySgAAApkwggKVBgkqhkiG9w0BBwagggKGMiICggIBADCCAnsGCSqGSIb3DQEHATAeBglghkgBZQ)

[451.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ySgAAApkwggKVBgkqhkiG9w0BBwagggKGMiICggIBADCCAnsGCSqGSIb3DQEHATAeBglghkgBZQ](https://watermark.silverchair.com/47-8-451.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ySgAAApkwggKVBgkqhkiG9w0BBwagggKGMiICggIBADCCAnsGCSqGSIb3DQEHATAeBglghkgBZQ) Acesso em: jan. 2020.

WONG, D.; MAKOWSKA, I. J.; WEARY, D. M. Rat aversion to isoflurane versus carbon dioxide. **Biol Lett.**, v. 9, n. 1, 23 Fevereiro 2013. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC356521/> Acesso em: 16 jun. 2019.

WOUNDEN, J.; MILLER, K. W. Capítulo 15: Farmacologia dos Anestésicos Gerais. In: GOLAN, D. E., et al. **Princípios da Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacologia**. 3. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan, 2014. p. 217-235. Disponível em:

<http://leg.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Farmacologia%20dos%20anestésicos%20gerais.pdf> Acesso em: 10 out. 2018.

APÊNDICE

POP de Eutanásia de camundongos do SCRL/ICTB/Fiocruz

Instituto de Ciência Tecnologia e Inovação em Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	
CÓDIGO POP-SCRL-115	DATA DE APROVAÇÃO 10/09/2020	REVISÃO 01
TÍTULO: Realização de eutanásia em roedores e lagomorfos		

1. OBJETIVO

Estabelecer sistematicamente para realização de eutanásia em roedores ou lagomorfos, no Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos (SCRL) do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biotecnologia (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.

2. APLICAÇÃO

Aplica-se a área de eutanásia de camundongos, ratos, hamsters, cobaias e coelhos do SCRL.

3. DEFINIÇÕES E SIGLAS

3.1 Definições

Eutanásia: É a prática de causar a morte de um animal de maneira rápida e assistida para aliviar da dor e do sofrimento.

3.2 Siglas

AmGM - Animais Geneticamente Modificados
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
g - grama
ICTB - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biotecnologia
Rg - Quilograma
mg - Miligrama
mL - Mililitro
mM - Milimolar
MPA - Medicina Pré-anestésica
OGM - Organismo Geneticamente Modificado
POP - Procedimento Operacional Padrão
SCRL - Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos

Instituto de Ciência Tecnologia e Inovação em Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	
CÓDIGO POP-SCRL-115	DATA DE APROVAÇÃO 10/09/2020	REVISÃO 01
TÍTULO: Realização de eutanásia em roedores e lagomorfos		

4. RESPONSABILIDADES

Colaboradores de eutanásia: Realizar a eutanásia de roedores e lagomorfos conforme descrito neste POP, sob a supervisão de um médico veterinário; acondicionar as carcaças dos animais eutanásicos e encaminhá-las à Seção de Higienização e Esterilização.

Colaboradores de Área de Higienização: Receber os animais eutanásicos, acondicioná-los em sacos de resíduo infeccioso e dar prosseguimento ao descarte dos mesmos, de acordo com o "POP-SCRL-259: Descarte de Carcaças de Roedores e Lagomorfos".

5. MATERIAS UTILIZADOS

- Agulhas	- Acepromazina 1%
- Cloridrato de ketamina 10%	- Dazepal
- Estetoscópio	- Gás de Óxido Nitroso
- Gaze	- Isoflurano
- Saco plástico para resíduos infecciosos	- Seringas
- Soro fisiológico ou água para injeção	- Solpa
- Tópicos adóscos	

6. PROCEDIMENTOS

A temperatura da sala de eutanásia deve ser mantida entre 20 e 22 °C e a umidade entre 50 e 70% para todos os animais.

A separação de grupos de animais a serem submetidos à eutanásia deve obedecer à quantidade máxima permitida por gaiola, conforme tabela a seguir:

Camundongos	Camundongos Nestados	Ratos	Hamsters	Cobaias
40, separados por sexo	150	5, separados por sexo	10, separados por sexo	2, separados por sexo

 INSTITUTO DE SAÚDE RORÃO Município de Rorão - RO	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	 ICTB Instituto de Controle e Inspeção de Produtos Biológicos
CÓDIGO POP-SCRL-115	DATA DE APROVAÇÃO 10/05/2020	REVISÃO 01
TÍTULO: Realização de eutanásia em roedores e lagomorfos		

6.1 Eutanásia de camundongos (Neonatos, Desmamados e Adultos)

- Receber os animais destinados à eutanásia acondicionados em gaiolas apropriadas (medindo aproximadamente 41cm x 34cm x 17,5cm) e dispor as gaiolas na estante.
- Encher dois compartimentos da grade de aproximadamente 20 cm com 15mL de isoflurano em cada.
- Dispor os animais dentro da gaiola com os animais, evitando-se colocar as grades em contato direto com os mesmos.
- Programar o cronômetro em 10 minutos, que deverá ser a exposição mínima de isoflurano para cada grupo/gaiola. Após os 10 minutos, observar a parada respiratória e conferir a parada cardíaca com palpção digital na parede torácica ou eletrocardiograma constatar o óbito.
- Aguardar 10 minutos com os animais fora da exposição do anestésico, segundo a legislação vigente (Resolução Normativa nº07 da CONCEA).

Nota 1: Para camundongos de 0 a 10 dias de vida, utilizar o tempo mínimo de 30 minutos para exposição ao isoflurano. Após esses 30 minutos, deixar os animais por mais 10 minutos fora da exposição ao isoflurano, e antes de observar parada respiratória, conferir a parada cardíaca através de doppler vascular e constatar o óbito.

- Retirar as carcaças de gaiola para acondicionar nos sacos brancos leitosos para resíduo infectante, realizando a contagem para registro no formulário: "FORM-SCRL-086: Controle de eutanásia".
- Entregar os sacos para acondicionamento ao profissional da Área de Higienização para dar continuidade ao processo de descarte.

Nota 2: Camundongos não modificados geneticamente poderão ser destinados a alimentação de outros animais, portanto seus sacos deverão ser identificados com a escrita de "CONSUMO ANIMAL" e colocados no local da Área de Higienização. Os demais animais deverão ser colocados no freezer localizado no laboratório de resíduos, identificado com a sigla de OOM. Os sacos com animais geneticamente modificados deverão ser identificados com a sigla "GDM".

- Registrar o procedimento de eutanásia no formulário: "FORM-SCRL-086: Controle de eutanásia".

 INSTITUTO DE SAÚDE RORÃO Município de Rorão - RO	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	 ICTB Instituto de Controle e Inspeção de Produtos Biológicos
CÓDIGO POP-SCRL-115	DATA DE APROVAÇÃO 10/05/2020	REVISÃO 01
TÍTULO: Realização de eutanásia em roedores e lagomorfos		

- Colocar o coelho novamente na gaiola e aguardar que o animal esteja sedado e tranquilizado, observando a ausência de reflexos palpebrais, falta de resposta ao estímulo sutil no pavilhão auricular e ausência de reflexo ao pinçamento da região interdigital. O tempo aproximado para apresentação deste quadro é de 10 a 15 minutos.
- Preparar a solução anestésica de kg de fentanyl estéril com 10 mL de soro fisiológico ou água para injeção.
- Administrar 150 mg/kg do mesmo iô que corresponde a um volume mínimo de 0,5 mL, dependendo do peso do animal pela via endovenosa (veia marginal da orelha), utilizando seringa e scalp 27G ou jato 24.
- Fazendo uso do estetoscópio, verificar a ausência de batimentos cardíacos e de movimentos respiratórios. Observar a presença de mucosas pálidas ou cianóticas. Constatar o óbito.
- Acondicionar as carcaças em sacos brancos leitosos para resíduo infectante e entregar ao profissional da Área de Higienização para dar prosseguimento ao processo de descarte.
- Registrar o procedimento de eutanásia no formulário: "FORM-SCRL-086: Controle de eutanásia".

7. PRECAUÇÕES DE BIODIVERSIDADE

7.1. EPIs e uniformes

- Luvas de procedimento
- Jaleco manga longa ou macacão impermeável
- Máscara cirúrgica
- Máscara facial inteira para gases e vapores
- Sapatos descartáveis
- Touca descartável

8. FORMULÁRIOS UTILIZADOS

- FORM-SCRL-086: Controle de eutanásia

9. ANEXOS

Não se aplica.

 Instituto de Zootecnia IZOOTEC Fundação Odebrecht Cria	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		 ICTB Instituto de Zootecnia Conselho de Zootecnia
TÍTULO: Realização de eutanásia em roedores e lagomorfos			

10. DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

1. CONCEA. Resolução Normativa nº 37. Bases e Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. 2013.
2. Brasil. Lei nº 11.794/2008.
3. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. American Veterinary Medical Association, p. 121. Janeiro 2020. Acesso em: 24 janeiro 2020.

11. REVISÕES

Revisão Nº	Data	Descrição ou itens revisados
00	25/09/2017	PRIMEIRA VERSÃO DO DOCUMENTO
01	10/03/2020	REVISÃO GERAL

12. APROVAÇÃO

ELABORADOR	Mônica Souza Ferreira Pinto	
VERIFICADOR	Fabiane Pedding de Paiva	
APROVADOR	Isabel Maria Alexandro Filho	

CÓPIA NÃO CONTROLADA