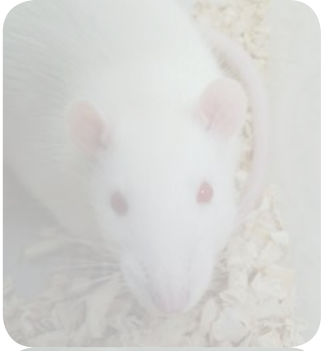
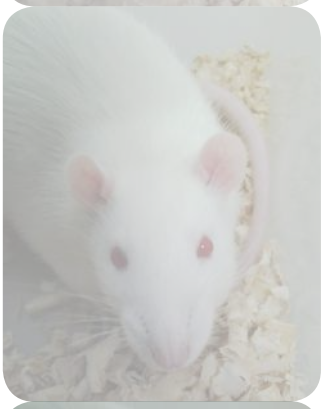
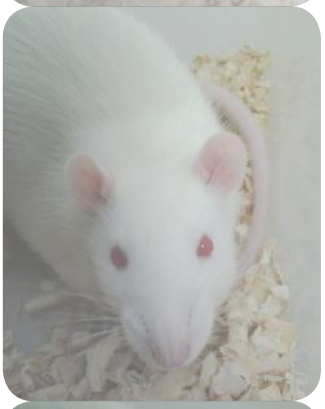




**Universidade de São Paulo**
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
**Instituto de Química (FCF-IQ/USP)**

# Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP

**Editores**

**Silvânia M. P. Neves**
**Jorge Mancini Filho**
**Elizabete Wenzel de Menezes**

**São Paulo**
**FCF-IQ/USP**
**2013**

**Universidade de São Paulo**
Reitor: Prof. Dr. João Grandino Rodas
Vice-Reitor: Prof. Dr. Hélio Nogueira da Cruz

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
Diretor: Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Vice-diretor: Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco

**Instituto de Química**
Diretor: Prof. Dr. Fernando Reis Ornellas
Vice-diretor: Profa. Dra. Maria Júlia Manso Alves

**Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**
Av. Prof. Lineu Prestes, 822
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo, SP
CEP: 05508-000
Tel.: 011 3091-3832 / 3091-3644
http://www.usp.br/bioterio

Produção Editorial e Gráfica, Diagramação: Fabiola Rizzo Sanchez
Normalização: Suely Campos Cardoso
Capa: Suely Campos Cardoso e Fabiola Rizzo Sanchez

# Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP

AUTORES
Silvânia M. P. Neves
Flavia de Moura Prates Ong
Lívia Duarte Rodrigues
Renata Alves dos Santos
Renata Spalutto Fontes
Roseni de Oliveira Santana

**São Paulo**
**FCF-IQ/USP**
**2013**

Neves, Silvânia M. P.
Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP / Silvânia M. P. Neves [et al.]. -- São Paulo : FCF-IQ/USP, 2013.
216 p. il.

1. Animais de Laboratório. 2. Biotério. 3. Biossegurança. 4. Experimentação Animal/ética. 5. Experimentação Animal/normas. I. Ong, Flavia de Moura Prates. II. Rodrigues, Lívia Duarte. III. Santos, Renata Alves dos. IV. Fontes, Renata Spalutto. V. Sanatana, Roseni de Oliviera. VI. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Instituto de Química, Biotério de Produção e Experimentação. VII. Título.

# Sobre os editores

## Silvânia Meiry Peris Neves

Zootecnista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

## Jorge Mancini Filho

Professor Titular. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Diretor da FCF-USP no período de 2010-2012.

## Elizabete Wenzel de Menezes

Professora Associada. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Membro da Comissão de Biotério desde 1995 e presidente desde 2000.

# Sobre os autores


## Flavia de Moura Prates Ong

MBA/USP – Especialista em Ciências de Animais de Laboratório. *Certification of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) – *Category C.* Biologista e Chefe da Seção de Experimentação do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.

## Lívia Duarte Rodrigues

Médica Veterinária e Técnica do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.

## Renata Alves dos Santos

MBA/USP – Especialista em Ciências em Animais de Laboratório. Biologista e Técnica do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.

## Renata Spalutto Fontes

MBA/USP – Especialista em Ciências em Animais de Laboratório. *Certification of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) – *Category C*. Engenheira Biomédica e Chefe da Seção de Produção do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.

## Roseni de Oliveira Santana

Técnica Patologista e Chefe da Seção Higiene e Esterilização do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.

## Silvânia M. P. Neves

Especialista em Ciências em Animais de Laboratório. *Certification of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) – *Category C*. Zootecnista e Chefe Técnica de Serviço do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.

# Apresentação

Este “Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório” é iniciativa do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os sete capítulos deste Manual tratam de temas centrais envolvidos na organização e manutenção de um biotério para criação e experimentação animal de padrão internacional. Os autores são membros da equipe do Biotério, têm a experiência prática obtida pela vivência diária associada à formação internacional especializada na área e são eles que mantém os seus elevados padrões técnicos. Ao mesmo tempo em que se dividem em funções especializadas, compõem uma equipe multidisciplinar, multiprofissional composta de biologistas, zootecnistas, veterinários, patologistas e engenheiros biomédicos, trazendo para o manual os diversos olhares profissionais e uma abordagem integrada.

O manual começa com oportuno capítulo sobre a História do Biotério, sobre sua evolução e sobre as gestões necessárias ao desenvolvimento no contexto universitário, nas múltiplas gestões da FCF e do IQ, e da própria USP. Ensina como chegou à estrutura atual, informatizada eficiente, com portal próprio como se vê nas estatísticas da produção de animais e dos ensaios biológicos de experimentação realizados.

Ao lado de questões organizacionais e de controle de qualidade o manual não esquece a questão hoje tão presente e importante para os pesquisadores, alunos e professores, relativa à ética na experimentação animal.

A organização dos temas, a experiência dos autores, e a própria história do Biotério tornam importante a iniciativa de tornar esse Manual num livro de divulgação mais ampla, que vai além de um simples manual de procedimentos. Certamente ele será uma leitura muito útil para todos os que trabalham com ciência e experimentação animal.

**Prof. Titular Franco Maria Lajolo**
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da

# Prefácio

O Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da Universidade de São Paulo é muito mais que um simples manual. Trata-se de uma obra de inestimável valor para todos os que criam ou usam animais de laboratório, tanto por seu valor científico quanto por sua abordagem multidisciplinar.

Iniciando com a saga dos autores para conseguir o nível de qualidade que obtiveram, algo importante para incentivar tanto os técnicos bioteristas quanto administradores de Instituições que trabalham com a Ciência de Animais de laboratório.

Seus diversos capítulos abordam de forma simples e elegante todas as áreas relativas à Ética, à arquitetura, ao manejo, à biossegurança enfim, toda a gama de conhecimentos relativos às Ciências de Animais de Laboratório.

A mescla de informações, dados informativos de padrões biológicos dos animais do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da Universidade de São Paulo, aliados a diversos POPs são fonte de inspiração para outros Centros de Produção e Experimentação seguirem o exemplo e procurarem contribuir com as informações de forma a se ter uma padronização em todo o País.

Por fim, somente a extrema dedicação, o profundo conhecimento e a vivência dos autores poderiam ter gerado um documento tão importante para todos.

Aguardemos com ansiedade a ampliação e as próximas edições!

**Profa. Dra. Vera Maria Peters**
Presidente da Sociedade Brasileira de Ciências
de Animais de Laboratório, SBCAL - 2012/2014

# Agradecimentos

Às diretorias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP), pelo apoio incondicional.

Às Comissões do Biotério da FCF-IQ/USP, pelo incentivo e apoio constantes.

A Yara M. L. Mardegan, pelo constante apoio administrativo, carinho e incentivo.

Aos funcionários do Biotério: Eliane J. Santos, Isael P. Araujo, José Galeote M. L. de Oliveira, José Roberto da Silva, Maria de Fátima R. Souza, Marcelo Lustosa, Matildes P. Ribeiro, Ricardo Pinheiro e Wagner Botelho, cuja colaboração foi imprescindível na elaboração deste manual.

Aos professores Elizabete Wenzel de Menezes e Jorge Mancini Filho, pelo incentivo e colaboração na elaboração deste manual.

Aos professores Alicia Kowaltowski, Célia Colli, Mari Cleide Sogayar, Maria Julia Manso Alves, Nadja S. P. Lardner, Primavera Borelli, Telma M. Kaneko e Terezinha de Jesus A. Pinto, pelo constante suporte no Biotério.

Às doutoras Sueli Blames Damy e Ubimara Pereira Rodrigues, pelo apoio, estímulo e colaboração.

Aos pesquisadores, alunos e técnicos da FCF-IQ/USP, usuários do Biotério, que nos apoiam nesta jornada.

Aos mestres doutores Adela Rosenkranze e Jean L. Guénet, sempre presentes e atuantes no ensino da Ciência em Animais de Laboratório.

Ao senhor Luciano Leite, pelo excelente suporte na elaboração do portal do Biotério FCF-IQ/USP.

Ao Instituto de Química - USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Alimentos e Nutrição da Universidade de São Paulo (NAPAN - USP), pelo apoio na edição e distribuição deste manual.

# Sumário

**Capítulo 1**
Histórico e Evolução do Biotério da FCF-IQ/USP.....1
Silvânia M. P. Neves

**Capítulo2**
Ética na Experimentação Animal.....9
Flávia de Moura Prates Ong, Silvânia M. P. Neves

**Capítulo 3**
Comportamento e Enriquecimento para Ratos e Camundongos.....15
Renata Alves dos Santos, Renata Spalutto Fontes

**Capítulo 4**
Seção de Produção de Animais *Specified Pathogen Free* (SPF).....43
Renata Spalutto Fontes, Renata Alves dos Santos

**Capítulo 5**
Seção de Higiene e Esterilização.....73
Roseni de Oliveira Santana, Lívia Duarte Rodrigues

**Capítulo 6**
Seção de Experimentação.....91
Flávia de Moura Prates Ong, Lívia Duarte Rodrigues

**Capítulo 7**
Controle Nutricional.....155
Silvânia M.P. Neves, Flavia M.P. Ong, Renata Spalutto Fontes

**ANEXOS**.....161

Capítulo 1

# Histórico e Evolução do Biotério da FCF-IQ/USP

**Silvânia M. P. Neves**

Histórico
Descrição do Biotério
Gestão
Informatização
Referências

## HISTÓRICO

Em 1985, a presente gestão iniciava suas atividades no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), a fim de instaurar os procedimentos necessários para a adequação à nova ciência que surgia, denominada Ciência em Animais de Laboratório. Dessa forma, foram introduzidos procedimentos preconizados por organismos internacionais para a criação de modelos biológicos de alta qualidade, que se mantêm desde então.

Na ocasião, o Biotério mantinha a criação de animais, classificada como padrão sanitário holoxênico/convencional[1], ou seja, animais de *status* sanitário não definido e que poderiam estar potencialmente contaminados com patógenos zoonóticos.

Até então, não havia treinamento técnico adequado para os funcionários condizente com a complexidade do serviço desenvolvido. Também não existiam conceitos básicos de segurança no trabalho e ética no trato com os animais, tampouco registros de produtividade, bem como controle genético, sanitário, nutricional e ambiental.

Assim, foram envidados esforços para aperfeiçoar e modernizar o espaço físico do Biotério, compartilhado entre a FCF-USP e o Instituto de Química da Universidade de São

Paulo (IQ-USP), sendo seu funcionamento calcado em áreas e gestões independentes. Os funcionários receberam treinamento, iniciando, assim, os primeiros conceitos de trabalho em equipe e de valorização pessoal, além de conscientização da importância na qualidade e no uso racional de animais de laboratório. Nesse momento, foram imprescindíveis a colaboração e o incentivo dos pesquisadores professores Franco Maria Lajolo, Walter Colli, Paulo Minami, Takako Saito e Maria Julia Manso Alves.

Com a instauração do controle da produção dos animais de laboratório, o estabelecimento correto dos sistemas de reprodução para as diferentes espécies existentes no Biotério, a aplicação dos conceitos de ética e bem-estar animal, as orientações para a segurança no trabalho, além das melhorias aplicadas na área de higienização dos materiais, inclusive com a aquisição da primeira autoclave de barreira, foi possível, em 1988, aprimorar a qualidade sanitária dos animais.

Nesse período, com o incentivo dos professores do Departamento de Alimentos da FCF-IQ/USP, iniciaram-se os primeiros estudos sobre a Avaliação Nutricional das Rações Comerciais para Ratos e Camundongos, procedimento fundamental na padronização da higidez dos animais de laboratório (Capítulo 7).

Em 1989, em visita a um dos maiores produtores de animais de laboratório, *Charles River Laboratories, Inc.* nos Estados Unidos*,* além de outros centros na Europa, foi possível conhecer a tecnologia desenvolvida para a produção de animais de laboratório segundo o padrão de gnotobióticos[1], fato que agregou novos conhecimentos para a produção de animais de alta qualidade, que garantissem resultados experimentais reprodutíveis. Assim, essa gestão recorreu às diretorias e às Comissões de Biotério da FCF-IQ/USP para solicitar melhorias. As solicitações foram gradativamente atendidas, até mesmo para suprir a uma demanda crescente e exigente.

Por consenso, as direções das duas unidades decidiram unificar as atividades, o espaço e a gestão do Biotério em 1992, mas somente a partir de 1997 efetivamente passou a existir uma gestão única**,** que recebeu a denominação de Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da USP.

Nesse período, o Biotério foi contemplado com o Projeto FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) – dentro do Programa de Infraestrutura “Implementação do Biotério Experimental da FCF-IQ/USP” –, elaborado pela Comissão de Biotério sob a coordenação da professora Maria Inês R. M. Santoro, o que possibilitou a realização da reforma do Biotério. Para essa reforma, foram considerados a limitação do espaço existente, a estrutura física do edifício, os conceitos de layout da época, bem como a necessidade de espaço para a realização dos ensaios biológicos pelos pesquisadores.

Durante a reforma, com o apoio das diretorias do FCF-IQ/USP e das assessoras

administrativas com suas equipes, foi cuidadosamente planejado, de acordo com as possibilidades existentes, o remanejamento de animais e funcionários para instalações provisórias, uma delas cedida pelo Instituto Butantan. Apesar dos incontáveis transtornos inerentes a qualquer reforma, o Biotério continuou atendendo os pesquisadores, que mantinham projetos de pesquisas com as agências de fomento. A Figura 1 apresenta a produção e o fornecimento de animais "Padrão Sanitário Convencional" de 1985 até 2000.

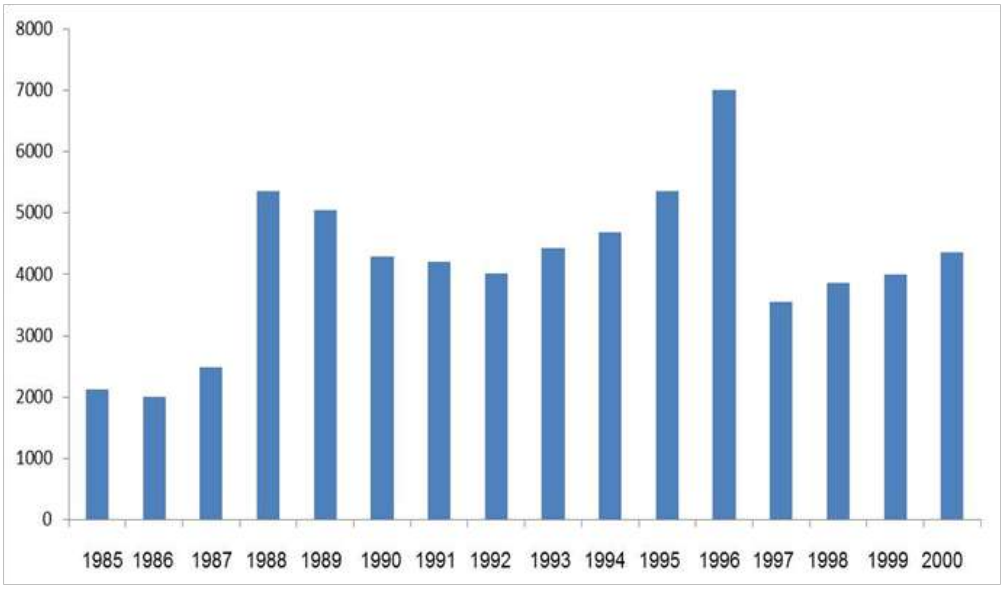



Figura 1. Produção e fornecimento de animais "Padrão Sanitário Convencional"

Em 2001, foram inauguradas as novas instalações do Biotério, que possibilitaram a introdução de novas tecnologias e, para oferecerem um trabalho altamente especializado, os técnicos do biotério receberam aprimoramento na área de Ciência em Animais de Laboratório, estabelecendo-se grupos de estudo referentes às atividades de cada funcionário dentro do Biotério. Isso resultou em melhorias no atendimento aos pesquisadores das unidades, otimizando a produção. Nesse mesmo ano, foram importadas várias linhagens de camundongos e ratos reprodutores provenientes das empresas Taconic – *Quality Laboratory Animals e Jackson Laboratory*, nos EUA, com o objetivo de iniciar a produção de animais *Specified Pathogen Free* (SPF)[1] (Capítulo 4).

A partir de então, o Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP vem seguindo diretrizes e padrões preconizados por órgãos nacionais e internacionais.

Cabe reportar que, em 2001, a coordenação do Biotério participou ativamente para a formação da rede de biotérios da USP, proposta elaborada pela Pró-Reitoria de Pesquisa, por iniciativa do professor Hernan Chaimovich.

## DESCRIÇÃO DO BIOTÉRIO

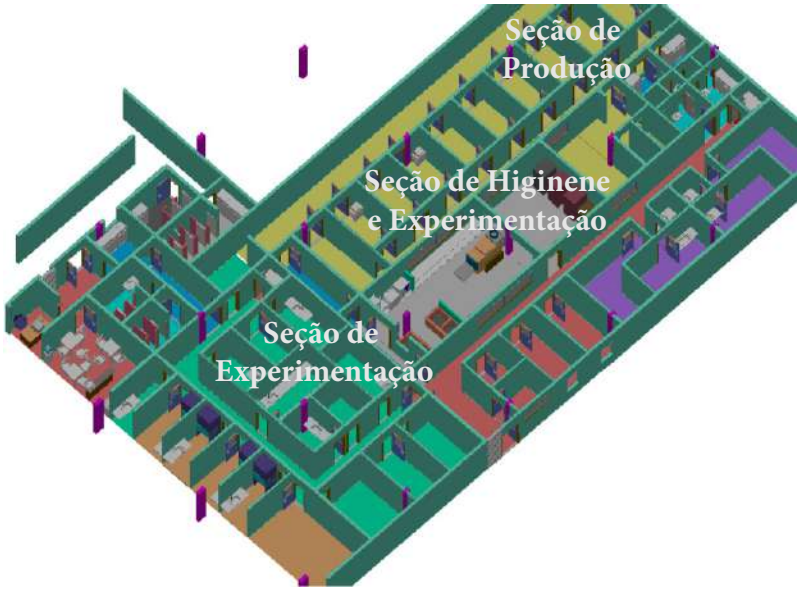



Figura 2. Seções do Biotério: visão geral

As instalações do Biotério são divididas em três áreas distintas: produção de animais *Specified Pathogen Free* (SPF); higiene e esterilização; e experimentação. O espaço físico compreende 860 $m^2$, sendo aproximadamente 200 $m^2$ para cada área e 260 $m^2$ para o complexo do sistema de ar condicionado. As três áreas são separadas por barreiras sanitárias e rígido sistema de fluxo operacional (Figura 2). Desde 2006 o Biotério deixou de ser um setor e, tornou-se uma diretoria técnica de serviço, de acordo com a estrutura organizacional da FCF-IQ/USP. Dessa forma, as três áreas distintas passaram a ser denominadas seções, cada uma delas com as respectivas chefias, o que possibilitou uma melhor distribuição operacional. Além disso, as chefias receberam treinamento internacional, outorgados com certificação da *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (Felasa)[2] *Category C*, regulamentando suas atividades na Ciência em Animais de Laboratório. As características das seções estão detalhadas nos Capítulos 4, 5 e 6.

A produção anual do Biotério é de 12 mil animais, que atendem a condições sanitárias, genéticas, nutricionais e ambientais definidas e padronizadas (Figura 3). Aproximadamente 60 pesquisadores da comunidade multiusuária da FCF-IQ/USP utilizam o Biotério, que dá suporte, por meio da seção de experimentação, a cerca de 70 ensaios biológicos/ano (Figura 4).

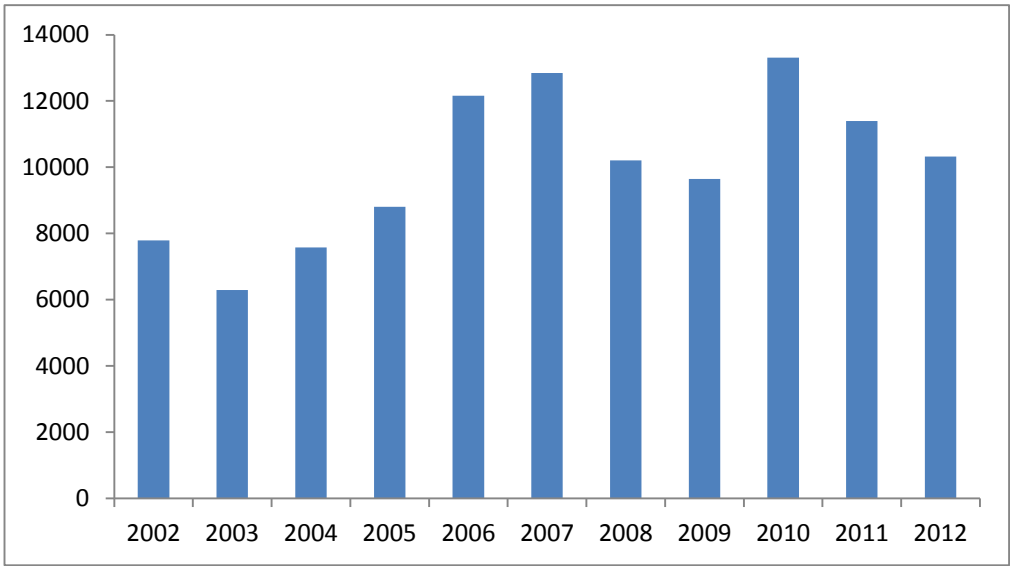



Figura 3. Produção de animais com padrão sanitário *Specified Pathogen Free*

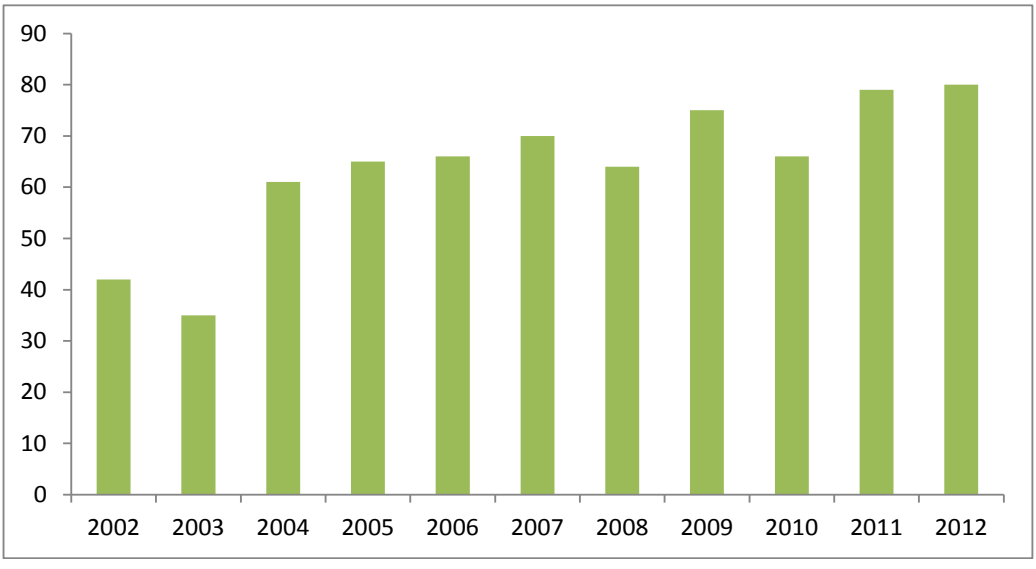



Figura 4. Ensaios biológicos realizados na seção de experimentação

## GESTÃO

O conceito de gestão é amplo e pode compreender diversos aspectos. Pode-se defini-lo como ação ou forma de administrar, controlar e dirigir todas as atividades de uma organização que são necessárias para um funcionamento eficaz, utilizando-se de recursos disponíveis[3]. Assim, para a obtenção de resultados eficazes, o Biotério tem os seguintes princípios norteadores:

**Missão:** Atender a comunidade multiusuário da FCF-IQ/USP, segundo as exigências éticas e produzindo animais com excelência;

**Visão:** Ser um centro de referência na Ciência em Animais de Laboratório;

**Valores:** Aprimorar constantemente os procedimentos que envolvem animais por meio do atendimento de padrões nacionais e internacionais, atualização continuada da equipe e dos alunos e compartilhamento do conhecimento.

O Biotério apresenta um modelo de gestão estratégica de práticas e padrões nos processos e no controle da qualidade, que contempla a gestão de pessoas, tecnologia, biossegurança e disponibilização da informação e do conhecimento[3], os quais estão apresentados nos demais capítulos deste manual. Isso permitiu ao Biotério atuar de acordo com as normas estabelecidas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*[4], atendendo às diretrizes da Política Ambiental da FCF-IQ/USP, determinadas pela NBR 14001[5], o que o levou a obter a certificação pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) em nível de biossegurança II (NB2)[6].

Atualmente, a equipe técnica é constituída por 14 profissionais, graduados e técnicos, devidamente qualificados na área de atuação e em constante processo de atualização. Além disso, esses profissionais têm clara definição de suas funções, bem como a competência e a responsabilidade necessárias para cumprir seu compromisso institucional.

O processo de planejamento, execução e controle das atividades do Biotério é discutido, executado, monitorado, registrado e informatizado junto com as equipes de cada uma das três seções, em um modelo de gestão compartilhada, que visa à eficácia e à eficiência.

## INFORMATIZAÇÃO

Com a informatização dos registros e a divulgação de conhecimentos na área da Ciência em Animais de Laboratório, a equipe do Biotério desenvolveu um portal em linguagem ASP com base HTML e acesso a um banco de dados personalizado (Figura 5)[7]. Dessa forma,

foi possível divulgar e controlar os processos de forma *on-line*, mantendo as informações atualizadas constantemente, bem como a interatividade de usuários por meio de ferramentas e soluções personalizadas.

O portal permite que o usuário utilize uma área restrita e acesse relatórios individuais sobre utilização de animais e sala experimental, emissão de normas e protocolos experimentais, solicitação de animais por meio de formulário padronizado, além de informações sobre biologia animal, modelos de animais produzidos no Biotério FCF-IQ/USP e artigos científicos sobre diversos assuntos referentes à Ciência em Animais de Laboratório.

A equipe do Biotério realiza registros e controles de cada seção por meio do portal, facilitando o acesso de dados e otimizando a comunicação entre as seções.

O website apresenta os seguintes benefícios:

- ✓ Administração *on-line* de cadastros, consultas e relatórios;
- ✓ Informações atualizadas;
- ✓ Emissão de relatórios personalizados;
- ✓ Controle de solicitação e fluxo de movimentação (utilização de animais e salas experimentais);
- ✓ Emissão de relatórios gráficos anuais das seções de produção e experimentação;
- ✓ Vídeos didáticos (em construção).

Figura 5. Layout inicial do website do Biotério FCF-IQ/USP

Este manual foi elaborado pela equipe do Biotério com o objetivo de registrar as principais atividades realizadas e compartilhar com outros profissionais e alunos o conhecimento adquirido ao longo de vários anos. Esta primeira edição vai facilitar a contínua atualização e os ajustes de procedimentos à medida que novos modelos e novas tecnologias são introduzidos.

Apesar da excelência conquistada na produção de animais de laboratório, o Biotério apresenta limitações físicas, fator impeditivo para a introdução de novos modelos experimentais, como os geneticamente modificados, tecnologia de ponta essencial para o desenvolvimento das linhas de pesquisas em expansão nas duas unidades.

Em 2010, por solicitação das Comissões de Biotério da FCF-IQ/USP, as diretorias das duas unidades aprovaram uma expansão do Biotério de 150 $m^2$, área convenientemente localizada e anexa ao Biotério.

O apoio incondicional das diretorias da FCF-IQ/USP, das Comissões de Biotério e das assessoras administrativas e financeiras, em conjunto com suas equipes, possibilitou ao Biotério operar de forma produtiva e eficiente, cumprindo de maneira satisfatória o objetivo de dar continuidade aos trabalhos.

## REFERÊNCIAS


1. Hedrich HJ, Bullock G. The laboratory mouse. North Carolina: Elsevier Academic Press; 2004. p. 409-33.
2. Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) [cited 2012 Aug 10]. Available from: http://www.felasa.eu/.
3. Vidal AR, Torrallardona AV. Organización, gestión de recursos y capital humano em investigación experimental. In: Zùñiga JM, Marí JAT, Milocco SN, Piñeiro R. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Madrid: Mcgraw-Hill Interamericana; 2001. p. 643-58.
4. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington: The National Academies Press; 2011. 248p [cited 2012 July 16]. Available from: http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf.
5. Norma técnica ABNT NBR ISO 14001:2004 [citado 16 jul. 2012]. Disponível em: http://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=1547.
6. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) [citado 19 set. 2012]. Disponível em: http://www.ctnbio.gov.br/.
7. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Biotério FCF-IQ/USP: website [citado 19 set. 2012]. Disponível em: http://www.usp.br/bioterio.

Capítulo 2

# Ética na Experimentação Animal

**Flávia de Moura Prates Ong**

**Silvânia M. P. Neves**

| | |
|---|---|
| Introdução | Treinamentos |
| Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) | Seção de experimentação |
| Princípio dos 3 Rs | Referências |

## INTRODUÇÃO

A experimentação animal tornou-se mais frequente na Europa, entre os séculos XVI e XVIII. Nessa época, os cientistas baseavam-se em opiniões como a do filósofo francês René Descartes (1590-1650)[1] e suas ideias sobre o mecanicismo. Para o filósofo, os animais não tinham a capacidade de sentir dor e eram considerados apenas máquinas complexas.

O avanço da tecnologia e dessa nova ciência, denominada "Ciência em Animais de Laboratório", vem mudando paradigmas e comportamentos de pesquisadores e profissionais que utilizam animais em pesquisa. Atualmente, temos plena consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere à dor, memória, angústia e instinto de sobrevivência (art. 2º – Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL)[2], devendo-se utilizar de todos os meios possíveis para minimizar a dor e o sofrimento do animal[3]. Os experimentos devem ser realizados de maneira ética e justificada, não abusando do direito do homem sobre os animais e evitando o sofrimento destes[4].

A regulamentação brasileira é recente, e a lei para uso de animais em experimentação foi sancionada a partir de outubro de 2008. A Lei Arouca[5] nº 11.794 regulamenta a criação e a utilização de animais em atividade de ensino e pesquisa científica em todo o território nacional.

Com o advento dessa lei, foram criados o Conselho Nacional de Experimentação Animal (Concea)[6], o Sistema de Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (Ciuca) e as normas para funcionamento das Comissões de Éticas em Uso Animal (CEUAS)[7,8], cujo objetivo é garantir o atendimento ético e humanitário do uso de animais para fins científicos.

## COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA)

Existem normas nacionais e internacionais que regem a experimentação animal. Entre elas está a submissão dos projetos de pesquisa que utilizarão animais à Comissão de Ética em Uso Animal da instituição a que pertencem. Cabe à comissão[7,8] analisar, emitir parecer e expedir certificado sobre os protocolos de experimentação realizados na instituição de acordo com critérios preestabelecidos de princípios éticos na experimentação animal e compatíveis com a legislação vigente. Essa comissão tem o poder de aprovar ou não os protocolos experimentais analisados segundo o cumprimento das normas éticas.

O Biotério atende duas unidades distintas da Universidade de São Paulo (USP): a Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e o Instituto de Química (IQ). Nesse contexto, o trabalho é realizado em conjunto com os dois Comitês[7,8] (Figura 1).

Participam dessas comissões professores da instituição, veterinários, biólogos, zootecnistas, membros de ONG protetoras dos animais e funcionários do Biotério.

Toda a documentação necessária para a submissão de projetos de pesquisa está disponibilizada no site da instituição ao qual a comissão pertence[7,8], bem como legislações vigentes, normas e princípios éticos na utilização de animais e formulários de solicitação de aprovação do comitê.

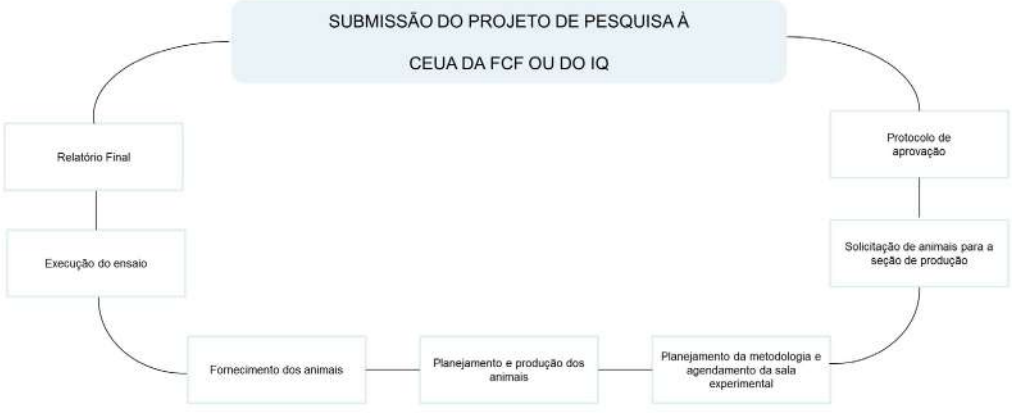



Figura 1. Fluxograma: Procedimentos envolvidos desde a submissão de projeto ao Comitê de Ética no Uso de Animais até a execução do ensaio

## PRINCÍPIO DOS 3 Rs

Em 1959, o zoologista William M. S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch publicaram o livro *The Principles of Humane Experimental Technique*, no qual estabeleceram o princípio dos 3 Rs, o que trouxe avanços para a pesquisa com animais e estabeleceu um grande marco para a Ciência em Animais de Laboratório[9].

Os autores conseguiram sintetizar o princípio humanitário de experimentação animal em três palavras importantes, o qual deve ser seguido no momento da elaboração dos projetos de pesquisas com animais. As três palavras originam-se do inglês e começam com "R", por isso passaram a ser denominadas como princípio dos 3 Rs: *Replace, Reduce* e *Refine*. Em sua proposta, Russel e Burch[9] sugerem a substituição do uso de animais por modelos alternativos não sensíveis, a redução do número de animais por experimento e o refinamento das técnicas e procedimentos que serão realizados nos animais.

O Quadro 1 resume cada uma dessas três palavras e sua importância para a pesquisa com animais.

Quadro 1. Princípio dos 3 Rs – *The Principles of Humane Experimental Technique*

| |
|---|
| *Replace* – consiste na substituição do uso de animais por modelos alternativos não sensíveis, sempre que possível, ou por animais com sistema nervoso menos desenvolvido. Dessa forma, a lei vigente no país criou uma câmara permanente intitulada Métodos Alternativos, para a validação e a divulgação desses métodos |
| Alguns exemplos de métodos de substituição ao uso animal são: modelos computacionais e matemáticos, teste *in vitro*, cultura de células, modelos e simuladores mecânicos, filmes e vídeos interativos para demonstração em aulas |
| *Reduce* – consiste na redução do número de animais por experimento, sem prejudicar a qualidade do resultado experimental. Esta pode ser obtida, por exemplo, com cálculos amostrais bem definidos e com a escolha do melhor modelo biológico a ser utilizado |
| Para o tratamento estatístico, podem ser considerados testes-pilotos, que muitas vezes, definem com mais precisão o número de animais a serem utilizados |
| A escolha do modelo adequado para o experimento implicará a redução do número de animais e a melhor qualidade do resultado final |
| A definição da linhagem também é um passo importante para a redução. Quando se utilizam animais isogênicos, por exemplo, retira-se a variabilidade genética do experimento, diminuindo, assim o seu n. Para isso, devem ser realizados questionamentos fundamentais para a escolha do melhor modelo, que são: |
| 1- Qual é a espécie? |
| 2- Qual é a linhagem? |
| 3- Qual é o padrão sanitário do modelo escolhido? |
| *Refine* – Os cientistas propõem que as técnicas e os procedimentos que serão realizados nos animais sejam menos invasivos e o mais refinados possível, sendo capazes de reduzir a dor, a angústia e o sofrimento animal. Esse refinamento abrange protocolos experimentais bem definidos de anestesia, analgesia, assim como a utilização, sempre que necessário, de anti-inflamatórios e antibióticos, no pré e no pós-cirúrgico (Capítulo 6) |
| Os métodos de coleta de sangue e imunizações também devem ser os menos invasivos possíveis, onde alguns métodos requerem a utilização de técnicas anestésicas e treinamentos |
| O treinamento da equipe envolvida no experimento é de suma importância. Todos devem ter conhecimento das técnicas e procedimentos que serão realizados nos animais, bem como de manuseio e métodos de contenção<br>Outro ponto importante é o reconhecimento de comportamentos específicos da espécie ou comportamentos de dor e estresse do animal. Esse reconhecimento proporcionará ao pesquisador a introdução de métodos de alívio, caso o animal necessite, e uma descrição mais precisa no monitoramento dos animais |

As pesquisas com animais atualmente estão fundamentadas em conceitos éticos e humanitários de utilização. Para haver ética no uso dos animais, é preciso haver conhecimento. Assim, quanto mais conhecimento sobre comportamentos específicos (Capítulo 3) e fisiologia da espécie, bem como treinamentos sobre procedimentos práticos, mais experimentos serão conduzidos com o intuito de diminuir a dor, a angústia e o estresse dos animais.

## TREINAMENTOS

O treinamento do pessoal envolvido com a experimentação animal garante o desenvolvimento de um trabalho ético e de melhor qualidade. O manuseio dos animais de maneira correta e uma boa contenção refletem na diminuição do estresse do animal e em um bom andamento do experimento[10].

Os CEUAS da FCF-IQ/USP[7,8] exigem treinamento dos alunos quanto aos procedimentos e técnicas que serão realizados nos animais. O Biotério realiza agendamentos de treinamento individual dos alunos e emite certificado, que deve ser entregue à Comissão de Ética da instituição, dando, assim, prosseguimento à análise do projeto (Anexo 24).

Anualmente o IQ-USP oferece, em seu curso de pós-graduação, a disciplina Animais de Laboratório, ministrada pela equipe do Biotério, entre outros profissionais, que oferecem aulas teóricas e práticas sobre os procedimentos com os animais, sendo apresentados também vídeos e fotos de procedimentos práticos (Capítulo 6).

Para a aula prática com os alunos desse curso, é realizado o agendamento prévio no Biotério, que apresenta um cronograma de datas disponíveis. Esses treinamentos incluem técnicas de manuseio e contenção e técnicas específicas de acordo com os procedimentos necessários em cada tipo de experimento. É comum o aluno apresentar certo receio ao manusear os animais, porém isso é minimizado ao longo do treinamento[11,12].

## SEÇÃO DE EXPERIMENTAÇÃO

Ao iniciar o experimento no Biotério, o pesquisador e/ou aluno responsável pelo experimento recebe as normas internas de biossegurança e um protocolo que deve ser preenchido, com questões específicas sobre o experimento a ser realizado (Anexo 22). Então, prossegue-se com o treinamento sobre a paramentação correta, fluxo de entrada e saída do Biotério, conhecimento das áreas comuns e da sala onde o experimento será realizado.

O responsável pela seção de experimentação recepciona o pesquisador, sanando todas as suas dúvidas sobre normas internas, como deve ser monitorado o experimento, onde adquirir materiais de trabalhos de rotina, entre outras questões que surgirão ao longo do experimento.

Após a submissão dos projetos de pesquisa às CEUAs das duas unidades, os protocolos aprovados são encaminhados ao Biotério, onde recebem um número de controle e são arquivados. Por meio das informações contidas nos protocolos, a equipe do Biotério controla a saída de animais para os pesquisadores, obedecendo aos critérios de quantidade de animais, espécie, linhagem e sexo.

## REFERÊNCIAS


1. Feijó AGS, Braga LMGM, Pitrez PMC. Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos. Porto Alegre: EDIPUCRS; 2010. 421p.

2. Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) [citado 8 ago. 2012]. Disponível em: http://www.cobea.org.br.

3. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington: The National Academies Press; 2011. 248p [cited 2012 Aug 22]. Available from: http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf.

4. National Institute of Health [cited 2012 Sep 5]. Available from: http://bioethics.od.nih.gov/animals.html.

5. Brasil. Planalto. Lei Arouca. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008 [citado 12 set. 2012]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm.

6. Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) [citado 12 set. 2012]. Disponível em: http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/310553.html.

7. São Paulo (Estado). Universidade de São Paulo (USP). Comissão de Ética em Uso Animal do Instituto de Química da USP [citado 12 set. 2012]. Disponível em: http://www2.iq.usp.br/bioterio/.

8. São Paulo (Estado). Universidade de São Paulo (USP). Comissão de Ética em Uso Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP [citado 12 set. 2012]. Disponível em: http://www.fcf.usp.br/Apresentacao/Colegiados/ANIMAL/Animal.asp.

9. Russel WM, Burch RL. The principles of human experimental technique [cited 2012 Sep 12]. Available from http://altweb.jhsph.edu/publications/humane exp/het-toc.htm.

10. Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. 708p.

11. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); 2004. 167p.

12. Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA). FELASA Recommendations for the Education and Training of Persons Working with Laboratory Animals: categories A and C. Laboratory Animal. 1995;29:121-31.

Capítulo 3

# Comportamento e Enriquecimento para Ratos e Camundongos

**Renata Alves dos Santos**

**Renata Spalutto Fontes**

Introdução

Comportamento de ratos e camundongos

- Comportamento materno

Alojamento e enriquecimento ambiental

- O que é enriquecimento ambiental?
- Como avaliar as estratégias de enriquecimento?
- *Refine* versus padronização

Tipos de enriquecimento ambiental

- Enriquecimento social
  - Enriquecimento com contato social
  - Enriquecimento sem contato social
- Enriquecimento físico
  - Complexidade
  - Enriquecimento sensorial
  - Enriquecimento nutricional

Referências

## INTRODUÇÃO

Um importante conceito de bem-estar dos animais é a **homeostase**, que significa que o animal está em harmonia com seu ambiente interno (temperatura, conteúdo hídrico etc.) e externo (temperatura ambiente, som etc.). A homeostase exige que o animal se adapte e tenha controle diante de situações diversas. Quando a homeostase não pode ser mantida, pode ocorrer desconforto ou estresse, com possível manifestação de doença ou comportamento anormal, como estereotipias[1,2].

**Estereotipias** são comportamentos repetidos de padrão simples, como movimentos em círculos ou pulos constantes na gaiola, que parecem não ter sentido e são típicos de animais alojados isoladamente[1].

É dever do ser humano promover o bem-estar dos animais, em que, juntos, contribuirão para o bem-estar de todos[2]. Segundo a Ciência em Animais de Laboratório, o bem-estar dos animais deve ser assegurado tanto na produção como na experimentação, mantendo o alojamento e as condições ambientais controlados (Capítulos 4 e 6).

Fazer um manejo e um transporte cuidadoso, bem como conhecer a importância, as necessidades e os comportamentos normais das espécies utilizadas como animais de laboratório, também são fatores essenciais para que se evite o estresse e possibilite a promoção do bem-estar animal, obtendo, assim, dados confiáveis e pesquisas satisfatórias.

## COMPORTAMENTO DE RATOS E CAMUNDONGOS

Ratos e camundongos de laboratório sempre mostram similaridade com a reprodução na vida selvagem[1]. Na natureza, ratos são escavadores e constroem túneis para dormir durante a fase clara do dia. Preferem viver nos sistemas de esconderijos (túneis) localizados próximos à água. Os túneis terminam em um compartimento, usado para ninho e armazenamento de comida. São animais sociáveis e desenvolvem uma hierarquia entre os grupos[3].

Os camundongos são pequenos e têm uma grande área de superfície por grama de peso corpóreo, resultando em mudanças fisiológicas em resposta às flutuações da temperatura ambiental. Demonstram capacidade de fazer ninho e toca, que os ajudam a manter a temperatura corpórea. Geralmente, não conseguem regular a temperatura do corpo tão bem como os grandes mamíferos e são intolerantes ao calor[1].

Ratos e camundongos apreciam o convívio em grupo. Nos biotérios, a inserção ou a retirada de animais de uma gaiola envolve um esforço adicional para o restabelecimento de novos grupos[1]. Isso se deve ao fato de que cada animal tem seu papel como dominantes ou dominados, desenvolvendo uma **hierarquia social**[1,2,3].

Deve-se tomar cuidado para assegurar a compatibilidade, principalmente entre machos adultos de camundongos, que podem brigar, a menos que sejam criados juntos desde o desmame e que seja obedecida a orientação de densidade populacional máxima por gaiola[4,5] (Capítulo 4 – Tabela 5). Mesmo assim, ainda podem ocorrer brigas entre eles depois dos dois meses de idade. Na linhagem de camundongos Swiss Webster e BALB/c, por exemplo, podem ocorrer ferimentos na cauda, na lombar ou em outras regiões. As brigas também são comuns entre machos reprodutores provenientes de gaiolas diferentes e agrupados em uma mesma gaiola.

Embora a **agressividade** em ratos seja rara, os machos brigam mais do que as fêmeas[4,6]. Machos reprodutores podem brigar se originados de gaiolas distintas e forem agrupados. Dependendo da linhagem, em situações de superpopulação, podem-se observar

brigas por disputa de território[4].

Quanto às fêmeas, tanto de ratos quanto de camundongos, podem ser alojadas juntas em qualquer idade, mesmo se forem provenientes de gaiolas diferentes ou já utilizadas como reprodutoras, sem que ocorram incidentes desfavoráveis. Em geral, as fêmeas só brigam, em alguns casos, para defender seus filhotes[7].

Um comportamento comum nos ratos é a **postura em pé** (Figura 1), usada para explorar o ambiente e lutar (entre ratos jovens, é uma forma de brincar)[8]. Por isso, é importante que as grades das gaiolas sejam altas, para permitir que os ratos observem fora da gaiola, além de facilitar a cobertura da fêmea pelo macho durante o acasalamento.

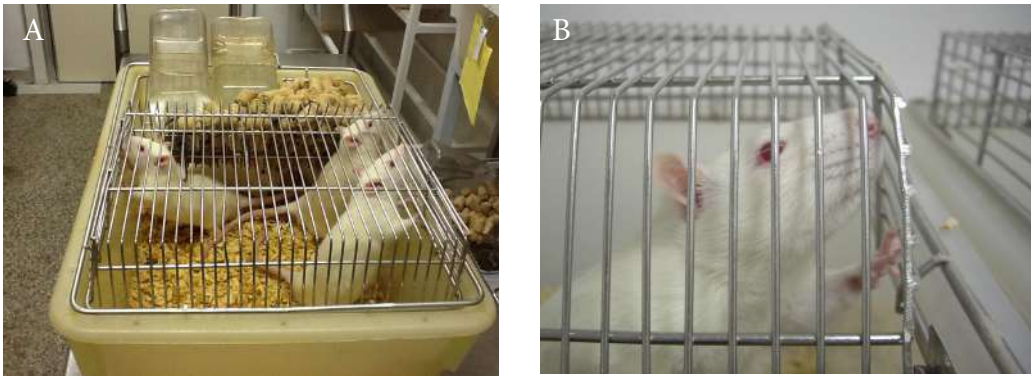



Figura 1. A) Ratos na postura em pé observando o exterior da gaiola; B) Vista aproximada

Ratos e camundongos têm o hábito natural de **coprofagia**[4,9,10,11], ou seja, ingerem as próprias fezes, o que pode alterar o efeito da dieta nos resultados experimentais relacionados à nutrição. Existe a possibilidade de que esse comportamento seja aumentado por dietas deficientes, porém, até mesmo com dietas adequadas, pode ocorrer a reingestão das fezes[4,11], por se tratar de um comportamento natural dos roedores. O uso de gaiolas com chão de arame em experimentos não previne a coprofagia, pois eles podem retirar as fezes diretamente do ânus[10]. Além disso, testes de preferência indicaram que roedores preferem piso sólidos com cama a pisos de arame[12]. Os pisos de arame não permitem que os animais desenvolvam seus comportamentos normais, os deixam inseguros e comprometem o seu bem-estar. Se for mesmo necessário o seu uso, seu tamanho e espaçamento precisam ser proporcionais ao tamanho do animal alojado, para minimizar o desenvolvimento de lesões na superfície plantar das patas[5], assegurando o conforto dos animais.

As espécies apresentam diferentes habilidades auditivas. Entre elas, ocorre uma variação considerável na audição de altas e baixas frequências[13]. Alguns animais são capazes de captar frequências de som mais elevadas do que as captadas pelos ouvidos humanos (**ultrassons**) (Figura 2), fazendo uso disso para a comunicação. Alguns ultrassons

produzidos pelos animais, como os ratos e os camundongos, são inaudíveis pelo homem, como o som produzido na comunicação sexual ou para evitar que os filhotes se afastem do ninho. Os filhotes comunicam-se com a mãe por meio da emissão de vocalizações de alta frequência. Outras vocalizações podem ser escutadas por nós, como no caso das emitidas em agressões[1,2,3].

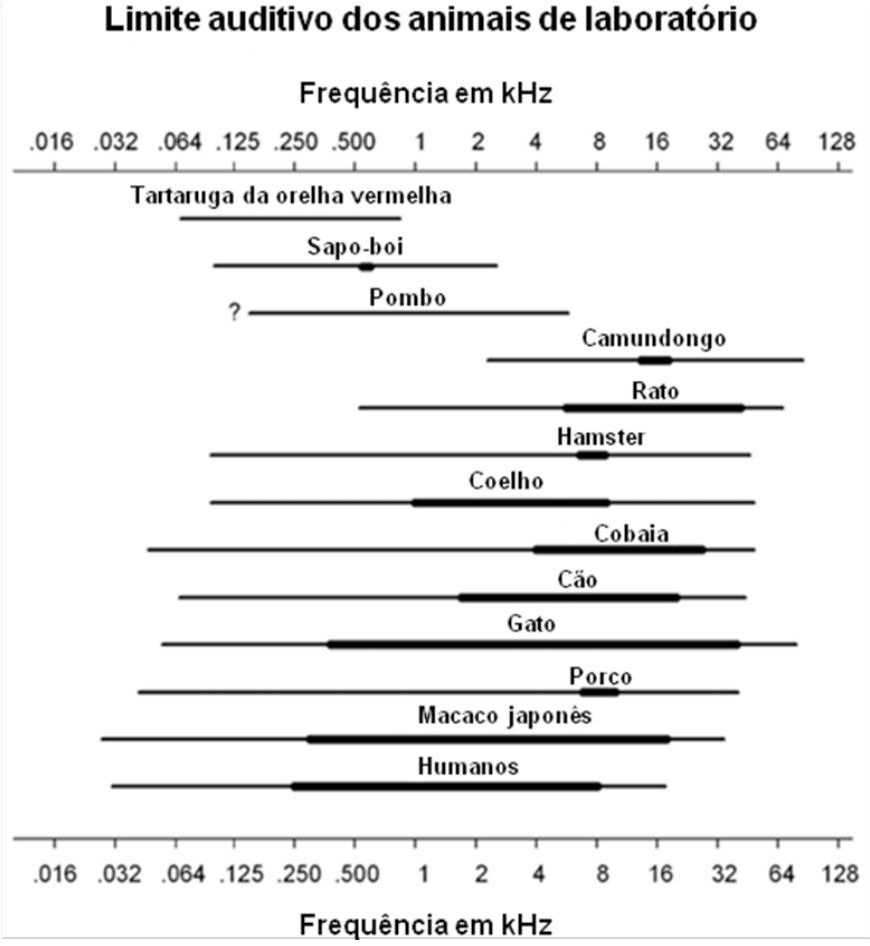



Figura 2. Limite auditivo dos animais de laboratório em relação ao dos humanos. (Fonte: Adaptado de Heffner[13])

Os **sons** produzidos, como o de cortejo, cuidado materno, agressão e defesa, podem ser afetados pelo nível de ruído no ambiente. Os animais podem se adaptar aos ruídos contínuos no ambiente, mas os ruídos de longa duração e alta intensidade ou agudos são perturbadores, causando estresse, alterações metabólicas, redução da fertilidade, canibalismo e danos ao aparelho auditivo. Alguns equipamentos utilizados nos biotérios e laboratórios emitem sons que podem estressar os animais sem que tenhamos conhecimento, como da água corrente

ou de mangueiras de pressão. Gaiolas com superpopulação também geram ultrassons, que podem dificultar a comunicação entre os animais e causar estresse[2,4,14].

Ratos e camundongos são **homeotérmicos**, ou seja, controlam a temperatura corporal, independentemente da variação térmica do ambiente, variando sua taxa metabólica. Variações bruscas de temperatura e umidade podem causar estresse, queda de resistência e maior suscetibilidade a infecções, acarretando problemas respiratórios em animais mantidos em alta umidade e/ou baixas temperaturas[4].

Animais mantidos abaixo da temperatura ideal apresentam constrição dos capilares superficiais, piloereção, postura enrodilhada, aumento da ingestão de alimentos e da construção de ninhos[4].

Ratos e camundongos têm **ciclo circadiano**. O padrão de ciclo claro/escuro geralmente é de 12 h claro/12 h escuro. Esse ciclo pode ser aumentado para 14 h para fins de pesquisas. São animais de hábitos noturnos, porém, segundo alguns autores, o camundongo, diferentemente do rato, é um alimentador diurno, consumindo a maioria de sua alimentação no período de luz[7]. Em razão do ciclo circadiano, a troca da gaiola suja dos animais deve ser mantida sempre no mesmo horário, assim como o manuseio durante os ensaios experimentais.

Apresentam boa visão, mas, como são animais noturnos, evitam a luminosidade intensa[15]. A **luz** pode afetar a fisiologia, a morfologia e o comportamento de diversos animais, e a iluminação inapropriada é estressante. Os animais albinos são mais sensíveis às altas intensidades de luz, mesmo que para nós pareça confortável. Em longo prazo, a luz intensa pode causar lesões em suas retinas[2]. O período de exposição à luz pode afetar o comportamento reprodutivo dos animais, assim como o peso e a ingestão de alimentos. Por isso, são utilizados temporizadores em biotérios para controlar os ciclos claro/escuro. Mudanças nesse ciclo requerem duas semanas para adaptação dos animais[4] e devem ser realizadas de maneira gradual, e não abrupta[16].

O sentido mais desenvolvido e importante dos ratos e camundongos é o **olfato**. Por meio de odores naturais ou da urina, os machos demarcam território. São capazes de identificar alimentos, membros do sexo oposto, intrusos e ainda reconhecer o odor da pessoa que limpa a sua gaiola e lhes fornece alimento[4]. Por isso, o experimentador deve evitar o uso de perfumes, anestésicos voláteis e a presença de sangue fresco em aventais ou sobre bancadas. Além disso, durante um experimento, recomenda-se não mudar o técnico responsável pela troca das gaiolas. Se por acaso houver a troca do técnico ou do pesquisador, os roedores ficam mais agressivos até a adaptação aos odores da pessoa nova[2]. Também pode haver queda na produção dos animais.

As longas **vibrissas** (Figura 3) próximo ao focinho presentes nos ratos e camundongos funcionam como receptores tácteis, e servem para detectar a presença de objetos ao seu

redor, mesmo que estes não tenham odor. Como é um animal noturno, as vibrissas permitem orientá-lo na escuridão. A sensibilidade olfativa e a sensibilidade táctil (vibrissas) constituem os principais sentidos desses animais, o que lhes possibilita detectar os alimentos, o sexo oposto e os predadores. O tato também é exercido pela superfície plantar das patas[2,3]. Quando estressados, os roedores se aproximam das superfícies, sentindo-se mais seguros. Gaiolas aramadas impedem o contato com piso sólido, alterando seus comportamentos normais[15].

Figura 3. Vibrissas presentes próximo ao focinho do rato

Os ratos e camundongos não têm glândulas sudoríparas. A **cauda** tem papel na termorregulação, na qual a vasodilatação dissipa o calor e a vasoconstrição conserva o calor. Nos animais recém-nascidos (até o final da primeira semana de idade), não existem mecanismos termorreguladores[4]. Aconchegam-se na mãe e nos outros filhotes para manter a temperatura ideal. Assim, se forem abandonados fora do ninho poderão morrer de hipotermia[4]. Por isso, é muito importante que os **neonatos** utilizados em experimentos sejam logo utilizados e posteriormente eutanasiados (Capítulo 6) assim que retirados da mãe, pelo fato de não regularem a temperatura corpórea (são poiquilotérmicos)[3] e pela ausência do leite materno.

As duas regiões do estômago (grande porção aglandular ou estômago anterior, e a porção glandular) são separadas por uma prega limitante que previne a capacidade de

**vomitar**[4,9], facilitando os procedimentos de gavagem (Capítulo 6).

Têm o hábito de **limpeza** *(grooming*), que faz com que a secreção oleosa produzida pelas glândulas da pele seja distribuída pelo corpo, mantendo a pelagem limpa e com brilho[4]. A falta desse hábito indica que o animal está com algum problema[15].

A cromodacriorreia é causada por uma secreção de um pigmento de coloração avermelhada (**porfirina**) nos olhos e no nariz, indicando sofrimento ou estresse (Figura 4). Esta pode ocorrer pela liberação da amônia no ambiente decorrente da falta de troca das gaiolas, pela falta da ventilação ambiental ou pela liberação de gases irritantes produzidos por produtos de limpeza[4].

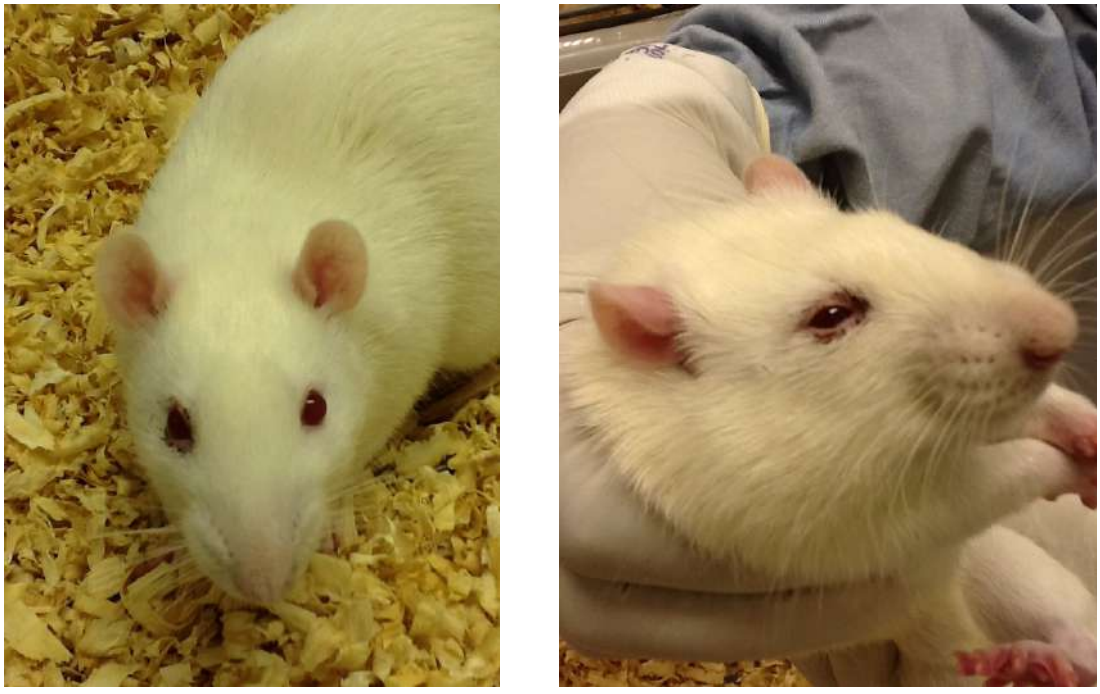


Figura 4. Secreção de porfirina nos olhos de ratos

Os roedores gostam de brincar e é por meio das **brincadeiras** que vão desenvolvendo sua maturidade emocional. Portanto, deve ser proporcionado espaço suficiente nas gaiolas para o animal se esconder ou lutar, para que se preparem para situações estressantes do futuro. É com os pais e congêneres que aprendem os comportamentos normais da espécie[2]. O enriquecimento ambiental é uma forma de contribuir para essas brincadeiras e será discutido a seguir.

O **barbeamento** (*barbearing*) é um comportamento dominante observado em algumas linhagens de camundongos que pode ser causado por excesso de animais na gaiola, idade

de desmame ou dieta. O camundongo dominante realiza a tricotomia dos seus companheiros submissos na mesma gaiola, em várias regiões como focinho, corpo ou cabeça (Figura 5). Geralmente, observa-se somente um camundongo com os pelos normais (dominante) em relação aos demais. Ao retirar o animal dominante, outro assumirá essa função. Apesar desse comportamento, deve-se entender que os camundongos são animais sociais e devem ser mantidos em grupos compatíveis[1,4].

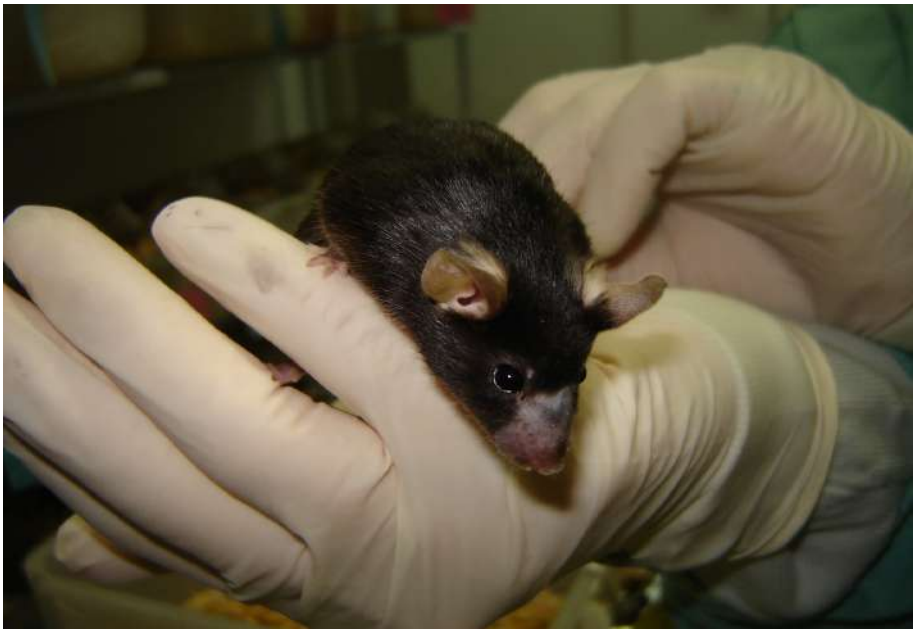


Figura 5. Macho reprodutor da linhagem C57BL/6 com falha de pelo no focinho causada pela fêmea dominante na mesma gaiola

É importante que se conheça o comportamento normal desses animais para que se possa comparar com o comportamento de **dor**. Ratos e camundongos podem sinalizar que estão com dor quando apresentam perda de peso, vocalização, postura curvada, piloereção, entre outros sintomas[17,18] (Capítulo 6).

Fêmeas alojadas juntas em grande número, sem a presença de machos, entrarão em fase de anestro (ausência de ciclos estrais), diestro ou pseudoprenhez. Esse efeito é chamado de ***Lee-Boot***. Se forem expostas a feromônios de machos ou ao próprio macho, começam a ciclar de 48 a 72 horas. Essa reação é denominada efeito de ***Whitten*** e permite a sincronização da ovulação em grupos de fêmeas. Tais comportamentos são mais observados em camundongos do que em ratos[1,4,19].

Outro efeito frequente em camundongos é o de ***Bruce***, no qual durante o acasalamento das fêmeas por um macho, quando estas são expostas a outro macho ou aos seus feromônios em até 24 horas, pode haver a reabsorção de 50% dos embriões[19]. Isso ocorre porque o feromônio do segundo macho parece inibir a nidação, que é a implantação do óvulo na parede do útero, perturbando a secreção de prolactina[4]. Essas fêmeas entram novamente em estro em quatro a cinco dias[1]. Esse efeito não é observado em ratos.

## Comportamento materno

Fêmeas defendem seus filhotes com tenacidade e, após o nascimento de toda a ninhada, principalmente durante os primeiros oito a dez dias, o comportamento da mãe de lamber os filhotes estimula as funções digestivas destes[4]. Após o parto, podem-se ver as manchas brancas no abdômen dos neonatos, indicando quais filhotes estão ingerindo o leite. Este é um fator importante no caso de seleção ao nascimento[19,20] (Capítulo 4).

O comportamento materno em ratas é muito forte e confiável[3] (Figura 6). Os filhotes são amamentados 18 horas por dia na primeira semana de nascimento. A mãe lambe os filhotes para limpar as vias respiratórias e, após o término do parto, coloca todos os filhotes no ninho. Ratos lambidos por suas mães ao nascer se tornam adultos mais tranquilos, menos medrosos e menos estressados; além disso, ratas que foram lambidas pela mãe quando filhotes costumam adotar o mesmo comportamento quando tiverem suas crias[8].

Figura 6. Fêmea amamentado

O manuseio dos neonatos deve ser rápido, porém com cautela, para evitar que a mãe diminua os seus cuidados e deixe de lambê-los. Nos ratos, muitas vezes, a mãe os carrega de um lado para outro durante a troca das caixas sujas ou durante a observação da ninhada (Figura 7). Quando esse comportamento ocorrer, deve ser mantida distância da gaiola, reduzindo o ruído. Geralmente, a mãe adota esse comportamento para tentar encontrar um espaço onde possa colocar o neonato em segurança. Se ocorrer muitas vezes, porém, isso pode feri-los[8].

Figura 7. Fêmea do casal de ratos Wistar carregando os filhotes para protegê-los

O canibalismo dos neonatos depende da linhagem e, em muitos casos, pode ser minimizado quando os animais ficam em um lugar calmo, com pouca intensidade de luz e tenham material para fazer seu ninho[1], como será discutido a seguir. Fêmeas primíparas são mais suscetíveis a rejeitar a ninhada. Neonatos fracos, natimortos ou mortos após o nascimento podem ser devorados pela mãe[3], pois servem de fonte de proteína; a mãe também pode deixá-los junto com os outros filhotes vivos ou, para manter o ninho limpo, rejeitá-los e segregá-los no canto da gaiola[8].

Para evitar o canibalismo, ao manipular os neonatos, sugere-se friccionar as mãos na maravalha suja da gaiola quando for recolocá-los no ninho, para que a fêmea não estranhe o odor da luva. Além disso, deve-se evitar manipular os neonatos no momento do nascimento, quando ainda estão sujos de sangue[1].

Diversos fatores, como linhagem, ruídos altos no ambiente[7], mães mais velhas (mais

de 11 meses de idade)[21], manuseio inadequado, troca muito frequente das gaiolas, presença de técnico novo, falta de água ou comida, movimentos indevidos da gaiola, dieta inadequada e desnutrição das mães lactantes[22], podem induzi-las à prática de canibalismo nos filhotes.

## ALOJAMENTO E ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Como são sociáveis, os ratos e os camundongos devem ser alojados em grupos, evitando o isolamento, para assegurar que desenvolvam comportamento e fisiologia normais[3].

Alojamentos adequados que considerem o ambiente físico e social desses animais, assim como colônias bem supervisionadas e manejos adequados, são indispensáveis para a produção de animais de alta qualidade[23].

As necessidades físicas dos animais são supridas com dieta balanceada, clima controlado e boas condições de higiene, porém pode ocorrer estresse se o comportamento for restrito em condições de alojamento padrão. As gaiolas de laboratório geralmente não são adequadas para as necessidades comportamentais e psicológicas dos animais. Os hábitos dos roedores de explorar, descansar, escalar, limpar-se, procurar alimento, fazer ninho e comportar-se socialmente não são totalmente considerados. Nos biotérios, preocupa-se principalmente com o estabelecimento de normas de biossegurança e com a modernização do alojamento, com o intuito de minimizar variáveis, como doenças infecciosas, exposição a toxinas ou variações no ambiente. Contudo, essa padronização na manipulação dos roedores tem consequências adversas para os animais em termos de falta de complexidade em seu ambiente, limitando a capacidade dos animais de controlar seu ambiente físico e social[23-27].

### O que é enriquecimento ambiental?

O enriquecimento ambiental pode ser definido como uma alteração no ambiente dos animais cativos, fornecendo-lhes oportunidades de expressar seus comportamentos naturais[28,29,30]. É o termo usado para definir ações que visam aprimorar o ambiente, reconhecendo o problema potencial do bem-estar associado com a restrição do comportamento nos sistemas de alojamento[27].

A introdução do enriquecimento ambiental para roedores é um método usado para melhorar a qualidade de vida e o bem-estar dessas espécies cativas[25,30-33], permitindo-lhes expressar os comportamentos específicos da espécie[24,34]. No entanto, a mudança só pode ser

considerada “enriquecimento” se salientar o bem-estar animal e melhorar seu funcionamento biológico[27,35].

Em 1959, Russel e Burch já consideraram o enriquecimento como uma necessidade ética no ambiente dos animais de laboratório, com o objetivo de introduzir o *refine* tanto na criação como na experimentação[28] (Capítulo 2).

Na década de 70, o conceito de enriquecimento foi introduzido nos zoológicos e foi gradualmente adotado nos biotérios[27]. Atualmente, vem sendo bastante aceito em ambos os locais[36].

Os animais mantidos em ambientes altamente artificiais são modelos menos adequados para extrapolar resultados experimentais para humanos. Já os animais mantidos em ambientes enriquecidos podem ser mais estáveis tanto no aspecto fisiológico como psicológico, bem como melhor representantes das espécies, assegurando melhores resultados científicos[32].

Nos biotérios, o enriquecimento é geralmente pouco utilizado, por representar um acessório extra na rotina de manejo diária. No entanto, a ausência de um esconderijo onde o animal possa se sentir seguro o impedirá de expressar comportamentos típicos e, consequentemente, diminuirá o bem-estar.

## Como avaliar as estratégias de enriquecimento?

Para avaliar as estratégias de enriquecimento, primeiro devem-se compreender a história, o repertório natural, o estilo de vida e a complexidade do comportamento da espécie em questão[25,37].

O enriquecimento ambiental não é um luxo opcional, mas é oferecido para atender às necessidades comportamentais dos mamíferos, permitindo-lhes expressar seu comportamento, o que refletirá na fisiologia e até na imunologia. Por isso, o enriquecimento deve satisfazer curiosidades, fornecer atividades divertidas[37], permitir executar necessidades fisiológicas e comportamentais, como manter relações sociais, descansar, construir ninhos, explorar, alimentar-se, roer e se esconder[1].

É extremamente importante avaliar os benefícios para o animal e as preferências deste quando optar por determinado tipo de enriquecimento, bem como os efeitos que isso pode trazer sobre o comportamento típico da espécie, sobre os parâmetros fisiológicos, além do impacto nos resultados científicos e nas análises estatísticas. O resultado dependerá da linhagem, do tipo de enriquecimento e do parâmetro avaliado[34]. Por exemplo, diferentes linhagens de camundongos reagem de maneiras distintas em relação a um tipo de enriquecimento.

O enriquecimento deve permitir que os animais sintam-se totalmente seguros. Por exemplo, ratos e camundongos necessitam de fendas ou algum material para fazer ninho, de modo que possam construir esconderijos. Além disso, essas espécies talvez se sintam seguras se tiverem contato físico com companheiros[37]. Apesar de muitas gerações de domesticação, os hábitos de escavar e fazer ninhos persistem nesses animais[25].

Os testes de preferência podem ser úteis para avaliar os tipos de enriquecimento, pois permitem aos animais escolher entre várias opções, além de prevenir a introdução de itens prejudiciais ou sem interesse para os animais[29,38,39].

No Biotério da FCF-IQ/USP, o enriquecimento tornou-se um item importante nas seções de produção e experimentação dos ratos e camundongos, promovendo o bem-estar desses animais. Na escolha do tipo de enriquecimento levam-se em conta, entre outros fatores, as necessidades comportamentais de cada linhagem, bem como, o custo, a capacidade de manutenção da higiene e a resistência à autoclavação. Por se tratar de um biotério de grande produção de animais, alguns tipos de enriquecimento podem ficar inviáveis, por serem muito caros ou dificultar o trabalho realizado pelos funcionários e pesquisadores durante a troca dos animais.

Atualmente, o Biotério fornece como enriquecimento para ratos e camundongos: iglus, tubos de papelão e PVC, algodão, papel-toalha, papel em tiras e máscaras descartáveis. Além desses artefatos, a socialização desses animais é permitida, evitando-se mantê-los em grupos muito grandes ou isolados. Quando o isolamento é inevitável, algum artefato é introduzido na gaiola, com o intuito de evitar o estresse dos animais. Na seção de experimentação, por exemplo, são colocados iglus nas gaiolas metabólicas de camundongos isolados.

Testes relacionados à introdução de enriquecimento na produção dos ratos e camundongos foram desenvolvidos no Biotério. Tubos de PVC foram introduzidos em gaiolas de casais de ratos Wistar, cujos resultados mostraram uma tendência no aumento do número de filhotes nascidos em casais enriquecidos[40]. Em outro trabalho, o algodão foi introduzido em casais de camundongos C57BL/6, sendo avaliados vários parâmetros reprodutivos (taxa de fertilidade, intervalo entre partos, prolificidade, número e percentagem de filhotes desmamados, percentagem de mortalidade pré-desmame e ganho de peso de filhotes desmamados). Foram observados redução na mortalidade pré-desmame e aumento no peso de filhotes mantidos em gaiola *open cage* enriquecida[41].

A utilização do enriquecimento ambiental em biotérios está aumentando por razões éticas e científicas, porém atualmente nenhum manual de boas práticas de laboratório ou regulamento de bem-estar descreve o enriquecimento como um padrão[42].

Pesquisas são necessárias para investigar os efeitos dos diferentes tipos de enriquecimento ambiental nos resultados experimentais e na variabilidade dos parâmetros fisiológicos[43].

## *Refine* versus padronização

Um exemplo de *refine* (Capítulo 2) é a estratégia de enriquecimento ambiental[44], pela qual se obtém um melhor entendimento das necessidades dos animais e dos fatores ambientais envolvidos no controle do comportamento[42].

A implantação do enriquecimento é um tema polêmico, pelo fato de que possa perturbar a padronização ambiental, apesar dos benefícios para o bem-estar do animal de laboratório[45,46].

O argumento de que o enriquecimento ambiental possa aumentar a variação dos dados, reduzindo a precisão e a reprodutibilidade dos resultados experimentais, torna-se um importante obstáculo na criação de uma habitação enriquecida para roedores de laboratório. Isso significa que mais animais seriam necessários para cada experimento, criando assim um conflito entre *refine* e *reduce*[46].

Alguns autores, como Van de Weerd, Van Loo e Baumans[44], entretanto, afirmam que, quando o bem-estar dos animais é alcançado pelo programa de enriquecimento, estes sofrem menos estresse, têm mais saúde, há poucas perdas durante os experimentos e, assim, reduz-se o uso de animais. Um exemplo é o efeito benéfico do material para ninho.

Segundo Würbel e Garner[46], é provável que as condições habitacionais de camundongos de laboratório (pelo menos para as fêmeas) possam ser refinadas pelo enriquecimento ambiental, melhorando o bem-estar, sem afetar a padronização. Esses autores apoiam o enriquecimento do ambiente, porque acreditam que "o bem-estar é a melhor ciência", mas, ao mesmo tempo, alegam que, para a experimentação animal ser verdadeiramente uma "boa ciência", o conceito de padronização do ambiente tem de ser profundamente revisto.

## TIPOS DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Os tipos de enriquecimento geralmente são categorizados em sociais e físicos[30].

### Enriquecimento social

Enriquecimento social inclui a socialização dos animais, com contato ou não (denominadas "sem contato social") com coespecíficos ou contraespecíficos, inclusive os seres humanos[34,35].

Os seres humanos fazem parte do enriquecimento social dos animais de laboratório, e a manipulação dos animais é um aspecto muito importante na rotina diária.

### Enriquecimento com contato social

Espécies gregárias (que vivem em grupos ou em bando) devem ser alojadas em grupos ou pares com coespecíficos, de maneira harmoniosa[34]. Se alojadas individualmente, são privadas de expressar seus comportamentos sociais típicos[36].

Como são sociáveis, ratos e camundongos devem ser alojados em grupos, evitando o isolamento, para assegurar que desenvolvam comportamento e fisiologia normais. Como citado anteriormente, embora esta não seja uma situação natural para os machos, em algumas linhagens, especialmente as de camundongos, a agressividade é um problema, e os machos precisam ser separados[7,30].

Portanto, a mais complexa inclusão em uma gaiola é a de outro animal, pois a interação entre eles pode ser imprevisível[37]. Além disso, grupos muitos grandes estão mais propensos a doenças e a agressividade[47].

### Enriquecimento sem contato social

Esse tipo de enriquecimento inclui a comunicação visual, auditiva e olfatória com coespecíficos ou contraespecíficos (por meio de barreiras ou grades), sem o contato social, quando o alojamento em grupo não é possível[34]. Por exemplo, se um rato é alojado isoladamente, ele pode manter o contato visual, olfatório e auditivo com outros ratos para atenuar o estresse associado ao isolamento.

## Enriquecimento físico

O enriquecimento físico inclui gaiolas complexas e estímulos sensoriais e nutricionais[34].

### Complexidade

Disponibilizar uma estruturação adequada na gaiola é mais benéfico para os animais,

já que eles a utilizam em comportamentos específicos, do que oferecer uma grande área, onde não utilizam todo o espaço (exceto em atividades locomotoras)[34].

A maioria dos roedores tende a dividir a sua área em locais para alimentação, repouso e excreção. Essas divisões podem ser facilitadas por estruturas dentro da gaiola (exemplo: abrigos, caixas para ninho, tubos, materiais para fazer ninhos, plataformas etc.)[34].

Existem vários tipos de enriquecimento para animais de laboratório que podem ser improvisados (Figuras 8 a 12) ou que são comercializados (Figuras 13 a 17) e permitem a autoclavação. Caixas de animais escavadores podem ser facilmente enriquecidas com artefatos adaptados, como tubos de tamanho apropriado e materiais para a construção de ninho livres de toxinas[28] (como o algodão). Ainda há controvérsias quanto ao uso de tubos feitos de PVC.

Os ratos, diferentemente dos camundongos, não mostram interesse em construir ninhos, com exceção de fêmeas que acabaram de parir[47]. Segundo testes de preferência, ratos preferem objetos que possam ser mastigados, como um pedaço de madeira com furos[38].

É importante oferecer para os camundongos materiais para a construção de ninhos, pois isso permite que eles criem microambientes adequados para descanso e reprodução[3]. Camundongos são capazes de modificar o próprio microambiente, pelo fato de poderem aconchegar-se e manipular seus ninhos, exercendo controle sobre a temperatura, a umidade e as condições de luminosidade[1].

Os materiais utilizados na construção dos ninhos também fornecem sombra, além de ajudarem a regular a temperatura e servirem de abrigo para os animais se esconderem dos coespecíficos, evitando agressividade e controlando o ambiente[28,30,32]. Camundongos alojados em condições laboratoriais padrão (temperatura de 22±2 ºC) serão impedidos de manipular o seu microambiente e deixá-lo nas condições preferidas se não encontrarem materiais adequados para a construção de seu ninho[48,49].

Os materiais utilizados na construção do ninho precisam estar de acordo com as necessidades dos camundongos, por isso têm de apresentar as seguintes características: não devem ser tóxicos nem causar danos ao animal; devem ser absorventes, mas não a ponto de desidratar os neonatos; não devem conter pó excessivo; devem ser econômicos; não devem ser comestíveis, para evitar interferências nos experimentos[1]; devem ser duráveis ou descartáveis; devem ser livres de toxinas ou outros contaminantes[35]; e devem poder ser esterilizados ou descontaminados.

Figura 8. A) Rato no tubo de PVC; B) Fêmea de rato com filhotes dentro do tubo de PVC

Figura 9. Utilização de algodão como material para a construção de ninho pelos camundongos

A introdução de flocos de algodão nas gaiolas permite aos camundongos construir seus ninhos e abrigos, como se estivessem em seu ambiente natural, melhorando o seu bem-estar. O algodão, além de ser um material barato, é fácil de ser trocado durante a higienização das gaiolas, não é tóxico, é absorvente, pode ser autoclavado e não machuca os neonatos.

Figura 10. Papel-toalha na gaiola dos camundongos

Figura 11. A) Máscara descartável amarrada na grade das gaiolas de camundongos; B) Vista sob a grade

Figura 12. Papel picado é colocado na gaiola de camundongos

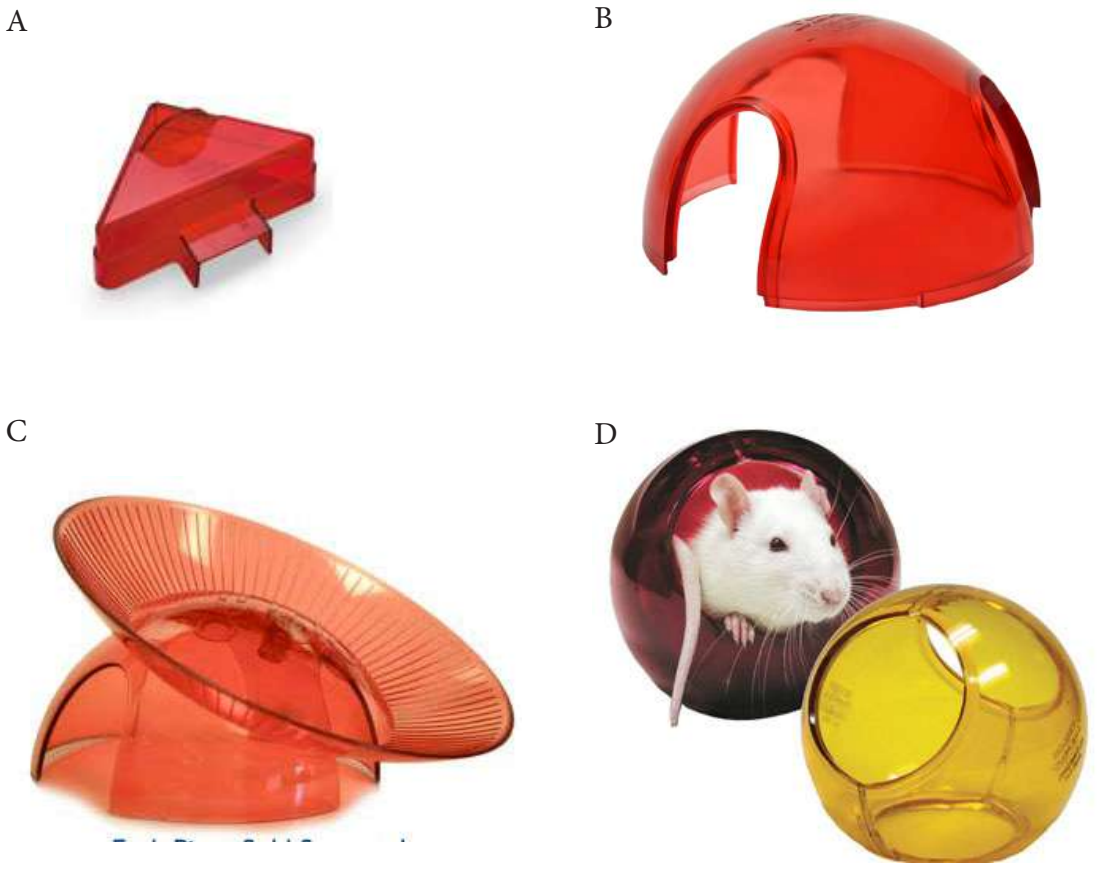



Figura 13. A) Iglu para camundongos. Disponível em: http://www.tecniplast.it/; B) Iglu para camundongos. Disponível em: http://www.alesco.ind.br/alesco.html; C) Iglu para camundongos com roda. Disponível em: http://www.bio-serv.com. D. Iglu para ratos. Disponível em: http://www.bio-serv.com

Figura 14. Camundongos em iglu

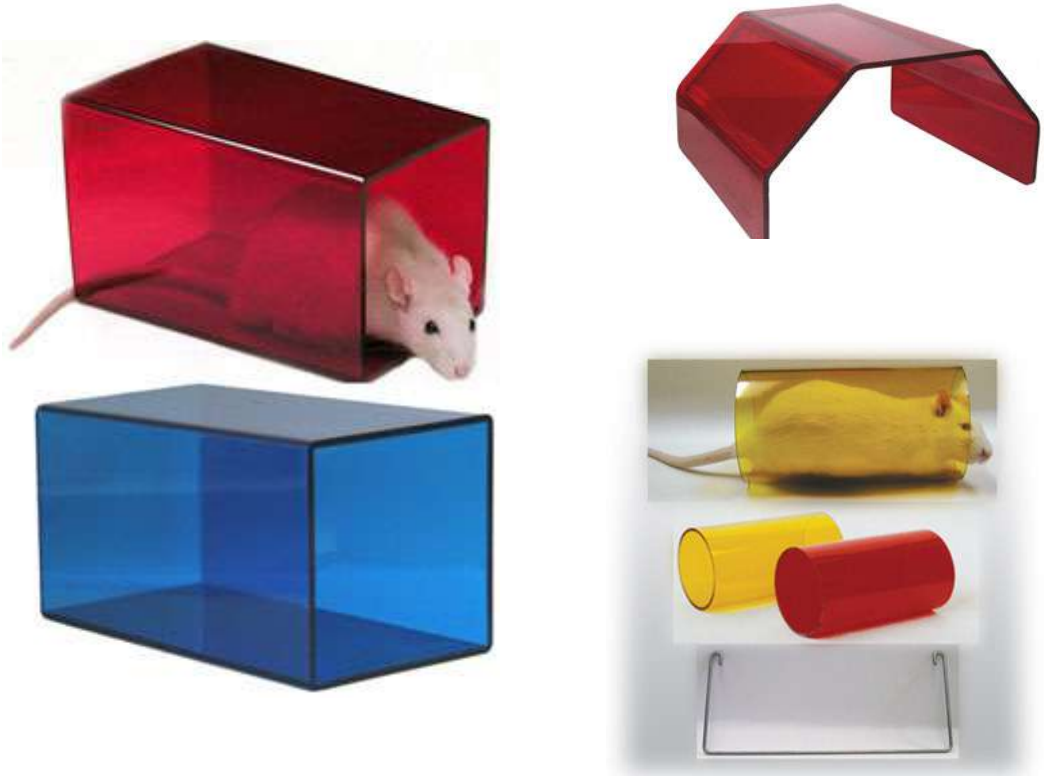


Figura 15. Abrigos para ratos. Disponível em: http://www.bio-serv.com

Figura 16. Tubos de papelão para ratos e camundongos comercializados. Disponível em: http://granjarg.com.br/insumos.php

Figura 17. Cabanas para camundongos. Disponível em: http://www.bio-serv.com/Rodent_Enrichment_Devices/Bio_Huts.html

## Enriquecimento sensorial

O enriquecimento sensorial inclui estímulos visuais, auditivos, olfativos, táteis e de paladar. Talvez o enriquecimento mais satisfatório para roedores e coelhos seja o visual, o auditivo, o olfativo e a comunicação tátil com coespecíficos ou contraespecificos, diretamente ou por meio das grades[34].

Tem sido sugerido que um ruído de fundo constante durante algumas horas do dia (por exemplo, uma música de rádio em volume de 85 dB) ofereça alguns benefícios na criação, diminuindo a excitabilidade dos animais e reduzindo o efeito dos sustos de ruídos repentinos[5].

A limpeza das gaiolas é rotina nas instalações para animais; no entanto, a remoção das marcas olfatórias perturba a hierarquia social dos animais na gaiola, muitas vezes

resultando em um pico de agressão entre camundongos machos. Tem sido demonstrado que transferir uma pequena porção do material para ninho antes da limpeza da gaiola ajuda a reduzir a agressão[50].

É possível realizar a estimulação tátil fornecendo materiais para ninho que possam servir de abrigo e ofereçam oportunidade para escavação[34], além de locais nos quais eles possam se refugiar da luz, pois são animais noturnos[30] e, na maioria das vezes, albinos.

### Enriquecimento nutricional

A mais óbvia forma de enriquecimento é aquela em que o animal tem alguma recompensa, como a comida[37].

Se a comida é usada para tratamentos ou enriquecimento ambiental, devem ser tomados cuidados para assegurar que nenhuma variação na dieta possa afetar resultados experimentais, garantindo que os animais tenham uma dieta balanceada[37].

Alimentos que dão ao animal a oportunidade de forragear (como um alimento espalhado na cama) ajudam a evitar o tédio, pois, na natureza, grande parte do tempo é gasta nessa atividade[30,34].

Segundo Poole e Dawkins[37], o efeito do enriquecimento no experimento é insignificante se os benefícios para o animal são a preferência. O enriquecimento é vantajoso para o uso de animais, pois satisfazem as suas necessidades comportamentais. Pode ser preferível a utilização de um ou dois indivíduos a mais em um experimento, por causa da variação adicional que o enriquecimento ambiental venha a causar, desde que haja uma completa perspectiva de bem-estar.

O enriquecimento ambiental é importante tanto do ponto de vista ético como científico. Do ponto de vista ético, melhora o bem-estar do animal. Do ponto de vista científico, evita que os animais apresentem comportamentos anormais, o que pode influenciar fisiologicamente os resultados experimentais. Atualmente, o enriquecimento ambiental resulta em animais mais normais em todos os sentidos e muito mais adequados para criação e experimentação[37].

## REFERÊNCIAS

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

2. Rivera EAB. Bem-estar na experimentação animal. In: Feijó AGS, Braga LMGM, Pitrez PMC.

Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos. Porto Alegre: EdiPUCRS; 2010. p. 74-88.

3. Koolhaas JM. The laboratory rat. In: Poole T. The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals. 7th ed. British: Blackwell Science; 2006. v.1, p. 313-30.

4. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo; 2004. 166p.

5. National Research Council. Guide for care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington: The National Academies Press; 2011 [Cited 2012 Feb 01]. Available from: http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf.

6. Souza NL. Comportamento, contensão e sexagem de espécies convencionais de laboratório. In: De Luca RR, Alexandre SR, Marques T, Souza NL, Merusse JLB, Neves SP. Manual para técnicos em bioterismo. São Paulo: Winner Graph; 1996. p.67-78.

7. Ko GM, De Luca RR. Camundongo. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p.137-65.

8. Ebisui L, Fontes RS, Lapchik VBV. Rato. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko, GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 229-50.

9. Hofstetter J, Suckow A, Hickman DL. Morphophysiology. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. The laboratory rat. USA: Elsevier Academic Press; 2006. p.93-125.

10. Hoitinga MR. Nutrition of laboratory mice. In: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P. The handbook of experimental animals: the laboratory mouse. USA: Elsevier Academic Pres; 2004. p.463-79.

11. Neale RJ. Coprophagy in iron-deficient rats. Laboratory Animals. 1982;16:204-7.

12. Manser CE, Morris TH, Broom DM. An investigation into the effects of solid or grid cage flooring on the welfare of laboratory rats. Laboratory Animals. 1995;29:353-63.

13. Heffner HE, Heffner RS. Hearing ranges of laboratory animals. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2007;46:11-3.

14. Teixeira MA, Filho AFL. Impacto dos fatores ambientais. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko, G.M. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p.101-11.

15. Rivera EB. Bem-estar animal. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p.59-69.

16. Housing and Husbandry Guidelines for Laboratory Animals. Research animal resources [cited 2012 Jan 20]. Available from: http://www.ahc.umn.edu/rar/housing.html.

17. Guidelines for pain and distress in laboratory animals: responsibilities, recognition and alleviation [cited 2012 Jan 18]. Available from: http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Pain_and_distress.pdf.

18. Rivera EAB. Analgesia em animais de experimentação. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p.247-53.

19. Santos BF. Criação e manejo de camundongos. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p.115-8.

20. Santos BF. Criação e manejo de ratos. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p.119-21.

21. Mohan C. Age-dependent cannibalism in a colony of albino rats. Laboratory Animals. 1974;8:83-4.

22. Petter WL. Cannibalism in rats and mice. Proceedings of the Royal Society of Medicine. 1968;61(12):1295-6.

23. Hedrich HJ, Mossmann H, Nicklas W. Housing and maintenance. In: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P. The handbook of experimental animals: the laboratory mouse. USA: Elsevier Academic Press; 2004. p.395-408.

24. Van de Weerd HA, Baumans V, Koolhaas JM, Van Zutphen LFM. Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. Journal of Experimental Animal Science. 1994;36:117-27.

25. Hutchinson E Avery A, Vandewoude S. Environmental enrichment for laboratory rodents. ILAR Journal. 2005;46(2):148-61.

26. Marques JM, Olsson IAS. The effect of preweaning and postweaning housing on the behaviour of the laboratory mouse (Mus musculus). Laboratory Animals. 2007;41:92-102.

27. Olsson AS, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. Laboratory Animals. 2002;36:243-70.

28. Gnadt BJ. Ethical and legal perspectives. In: Suckow MA, Weisbroth ST, Franklin CL. The laboratory rat. USA: Elsevier Academic Press; 2006. p.53-70.

29. Mattaraia VGM. Enriquecimento ambiental. In: Lapchik, VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p.537-47.

30. Van de Weerd HA, Baumans V. Environmental enrichment in rodents. In: Smith CP, Taylor V. Environmental enrichment information resources for laboratory animals: birds, cats, dogs, farm animals, ferrets, rabbits, and rodents. England: AWIC Resource Series; n. 2, setembro 1995. p.145-9.

31. Sherwin CM. The motivation of group-housed laboratory mice to leave an enriched laboratory cage. Animal Behaviour. 2007;73:29-35.

32. Van de Weerd HA, Van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V. Preferences for nesting material as environmental for laboratory mice. Laboratory Animals. 1997;31:133-43.

33. Van loo PLP, Blom HJM, Meijer MK, Baumans V. Assessment of the use commercially available environmental enrichments by laboratory mice by preference testing. Laboratory Animals. 2005;39:58-67.

34. Baumans, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. ILAR Journal. 2005;46(2):162-70.

35. Smith AL, Corrow DJ. Modifications to husbandry and housing conditions of laboratory rodents for improved well-being. ILAR Journal. 2005;46(2):140-7.

36. Steward K. Development of an environmental enrichment program utilizing simple strategies. Animal Welfare Information Center Bulletin. 2004;12(1-2):1-40.

37. Poole T, Dawkins MS. Environmental enrichment for vertebrates. In: Poole T. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 7th ed. British: Blackwell Science; 2006. v.1, p.13-20.

38. Chmiel DJ, Noonam M. Preference of laboratory rats for potentially enriching stimulus objects. Laboratory Animals. 1996;30:97-101.

39. Van de Weerd HA, Baumans V. Evaluation of environmental enrichment for laboratory mice. AWIC Bulletin. 1999;9(3-4) [cited 2011 Sep 05]. Available from: http://www.nal.usda.gov/awic/newsletters/v9n3/9n3weerd.htm#toc1.

40. Neves SP, Fontes RS, Ong FMP, Santos RA, Colli C. Enhancing laboratory rodents´ well-being by introducing environmental enrichment. In: Anals of 7th World Congress Rome; 2009 Aug 30 – Sept 3; Rome, Italy. Rome: Swiss Society ALTEX Edition; 2009. p.336.

41. Fontes RS, Santos RA, Ong FMP, Neves SMP, Balieiro JCC, Damy SB. Efeito do enriquecimento ambiental na produção de camundongos C57BL/6 mantidos em diferentes sistemas de alojamento. RESBCAL - Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. 2012;1(1):54-63.

42. Würbel H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. Trends in Neurosciences. 2001;24:207-11.

43. Augustsson H, Van de Weerd HA, Kruitwagen, CLJJ, Baumans, V. Effect of enrichment on variation and results in the light/dark test. Laboratory Animals. 2003;37:328-40.

44. Van de Weerd HA, Van Loo PL, Baumans V. Environmental enrichment: room for reduction? Alternatives to Laboratory Animals. 2004;32(Suppl 2):69-71.

45. Würbel H. Environmental enrichment does not disrupt standardisation of animal experiments. Altex. 2007;24:70-3.

46. Würbel H, Garner JP. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. NC3Rs - National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. 2007:1-9.

47. Lawlor MM. Comfortable quarters for rats in research institutions. In: Reinhardt, A. Comfortable quarters for laboratory animals. 9th ed. Washington: Animal Welfare Institute; 2002. p.26-32.

48. Hess SE, Rohr S, Dufour BD, Gaskill BN, Pajor EA, Garner JP. Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2008;47(6):25-31.

49. Sherwin CM. Observations on the prevalence of nest-building in non-breeding TO strain mice and their use of two nesting materials. Laboratory Animals. 1997;31:125-32.

50. Van Loo PLP, Kruitwagen CLJJ, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V. Modulation of aggression in male mice: influence of cage cleaning regime and scent marks. Animal Welfare. 2000;9(3):281-95.

Capítulo 4

# Seção de Produção de Animais *Specified Pathogen Free* (SPF)

**Renata Spalutto Fontes**

**Renata Alves dos Santos**

Introdução
Descrição da seção
Atribuições dos funcionários da seção
Procedimentos para solicitação de animais
Transporte de animais
Procedimentos para acesso de funcionários na seção
Procedimentos para introdução de materiais na seção
Animais de laboratório
- Características gerais de camundongos e ratos
- Parâmetros biológicos, fisiológicos e reprodutivos e consumo de alimentos

Ambiente e condições de alojamento
- Macroambiente
- Microambiente

Reprodução
- *Status* genético
- Manutenção de colônias de ratos e camundongos heterogênicos
- Manutenção de colônias de ratos e camundongos isogênicos
- Acasalamento para obtenção de embriões

Descrição dos modelos animais produzidos no Biotério
Controles sanitário, genético e nutricional
Referências

## INTRODUÇÃO

O objetivo deste capítulo é abordar informações essenciais relacionadas à produção

de ratos e camundongos no Biotério FCF-IQ/USP, com o intuito de auxiliar pesquisadores, alunos e técnicos em seus projetos de pesquisa. Cabe ressaltar que, para um conhecimento mais aprofundado sobre o assunto, existem diversas publicações que poderão complementar as informações contidas neste manual.

A pesquisa científica cada vez mais solicita padronização tanto dos procedimentos como dos animais de laboratório, para que se possam reproduzir resultados experimentais satisfatórios.

Essa padronização visa manter a qualidade genética, sanitária e nutricional dos animais, controlar as variáveis ambientais que possam influenciar sobre os animais e promover o bem-estar (Capítulo 3).

A utilização de animais com padrão de qualidade definidos permite a diminuição da variabilidade individual e a redução do número de animais utilizados na pesquisa (Capítulo 2), contribuindo com a ética, além de minimizar os riscos à saúde da equipe envolvida.

A seção de produção do Biotério FCF/IQ-USP dispõe de uma área física de aproximadamente 200 $m^2$ com edificação e infraestrutura adequadas para a produção e a manutenção de animais sanitariamente definidos ou *Specified Pathogen Free* (SPF)[1]. Os procedimentos estabelecidos visam à garantia do padrão de qualidade dos animais, impedindo a entrada de patógenos indesejáveis. A seção segue as normas de biossegurança para biotérios por meio da implantação de barreiras como Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) e Equipamentos de Proteção Coletiva (EPCs)[2,3] e respeita os princípios éticos exigidos na área de Ciências em Animais de Laboratório (Capítulo 2).

## DESCRIÇÃO DA SEÇÃO

A seção de produção destina-se à criação de animais sanitariamente definidos, portanto os materiais são esterilizados ou desinfetados antes de ser introduzidos na seção. Para manter esse padrão, existem barreiras sanitárias: autoclave de dupla porta, ar condicionado com sistema de pressão positiva, ausência de janelas, fluxo operacional e banho dos funcionários, para evitar a contaminação dos animais.

A seção é constituída por dez salas de produção e manutenção de animais, uma sala para estoque de material esterilizado, um escritório, um corredor para fluxo de material limpo, um corredor para fluxo de material sujo, um *pass-through* e um *air-lock* (expurgo).

### Salas de criação de ratos e camundongos

As salas para manutenção de animais em sistema *open cage* dispõem de estantes

para alojamento das gaiolas abertas e uma bancada para apoio no manuseio dos animais (Capítulo 6) e auxílio nas trocas das gaiolas.

As salas para manutenção de animais em sistema *Individually Ventilated Cage* (IVC) dispõem de *racks* ventilados e estação de troca para apoio no manuseio dos animais e nas trocas das gaiolas.

Todas as salas têm duas portas, sendo uma para acesso de material limpo e esterilizado e outra que permite o acesso ao corredor para fluxo de material sujo. As portas que dão acesso ao corredor limpo apresentam visores, para facilitar a observação dos funcionários e evitar que sejam abertas constantemente.

### Sala para esterilização e estoque de material

Essa sala conta com três autoclaves de barreira (dupla porta), por onde todo o material esterilizado deverá ser introduzido na seção, além de estantes para estoque de bebedouros esterilizados, espaço para estoque da ração irradiada e para estoque da maravalha esterilizada por autoclave. Os sacos de ração e de maravalha são dispostos sobre paletes, para evitar o contato com o chão.

Nessa sala é feito o preparo de todo o material que vai ser utilizado nas trocas das gaiolas (Anexo 9).

### Central de registros

Nesse espaço estão instalados os computadores utilizados como banco de dados e armazenamento dos arquivos da produção, com registros de todas as colônias, recebimento de solicitações de animais, realização de pedidos por meio do sistema Mercúrio, confecção de planilhas, bem como relatórios de produção e fornecimento de animais, planilhas para controle de temperatura e umidade, controle de consumo de insumos e elaboração dos Procedimentos Operacionais Padrão (POPs).

### Corredor para fluxo de material limpo

Todo o material (gaiolas, bebedouros, tampas) esterilizado é introduzido na sala de criação através desse corredor, destinado também ao fluxo de funcionários. Por esse corredor passa o material limpo utilizado na troca das gaiolas, no desmame de animais e na higienização das salas, não sendo permitido o fluxo de materiais sujos.

## Corredor para fluxo de material sujo

Nesse corredor somente é permitido o fluxo de material sujo (todo material utilizado nas salas de criação durante as trocas), o qual deve ser encaminhado para a seção de higiene e esterilização. Esse fluxo evita o cruzamento de material limpo com sujo, minimizando possíveis contaminações. No final desse corredor, há um *air-lock* onde todo o material sujo é depositado e retirado por um funcionário da seção de higiene e esterilização para posterior limpeza, desinfecção e esterilização (Capítulo 5).

### *Air-lock*

Trata-se de uma antecâmara com dupla porta, sendo uma para a seção de produção e outra para acesso à seção de higiene e esterilização. Essa antecâmera mantém uma pressão negativa em relação à seção de produção, para evitar a entrada de ar contaminado. Nesse espaço é depositado todo o material sujo que sai da seção de produção para posterior higiene e esterilização, sendo também destinado à saída dos funcionários da seção de produção após o término das atividades.

### *Pass-through*

Conta com duas portas com intertravamento, permitindo a abertura de uma porta por vez e evitando a contaminação cruzada entre as seções de produção e experimentação (Capítulo 6).

Os animais destinados à experimentação são retirados da seção de produção por esse acesso.

A Figura 1 apresenta o fluxo de materiais na seção.

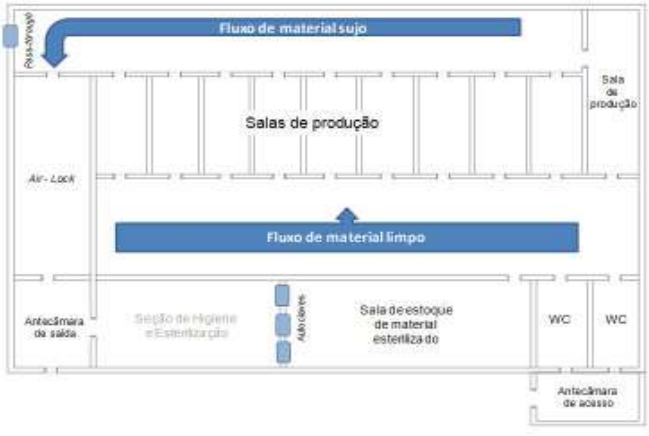



Figura 1. Mapa do fluxo de materiais limpos e sujos na seção de produção

## ATRIBUIÇÕES DOS FUNCIONÁRIOS DA SEÇÃO

A equipe da Seção de Produção é composta de um auxiliar, dois técnicos de nível médio, um técnico de nível superior e um especialista que atua como chefe da seção. A equipe recebe treinamento contínuo e específico na área de Ciências em Animais de Laboratório.

Cada colônia tem um funcionário específico, responsável pelos seguintes cuidados: trocas de gaiolas, desmames de filhotes, desinfecção das salas, acasalamentos e fornecimento de animais com supervisão do chefe da seção.

O chefe da seção é responsável pelo estabelecimento do fluxo operacional, coordenando as atividades dos funcionários, orientando na manutenção das colônias tanto na perpetuação da linhagem, garantindo seu padrão genético, como na produção de animais para pesquisa.

Os funcionários respeitam o fluxo de trabalho preestabelecido, para evitar possível contaminação e garantir a qualidade sanitária. Para isso, devem seguir os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) de cada colônia, que incluem a rotina de trocas de gaiolas e bebedouros, a manutenção da colônia e a higienização da sala (Anexos 10 e 11). Os POPs foram elaborados pela equipe do Biotério e respeitaram a infraestrutura da seção.

## PROCEDIMENTOS PARA SOLICITAÇÃO DE ANIMAIS

As solicitações de animais devem ser enviadas com antecedência pelo pesquisador, para que se possa programar o fornecimento de acordo com as exigências de idade, peso, sexo, quantidade e data prevista para o ensaio. A produção é feita com base nos animais previamente solicitados e nos animais que serão futuros reprodutores. Para garantir uma produção adequada, respeitando os princípios éticos, é necessária a colaboração do pesquisador nas solicitações, realizadas conforme as normas estabelecidas, e principalmente conhecer as características das linhagens quanto ao seu desempenho reprodutivo. Esse conhecimento é indispensável para realizar a programação de produção de animais (calcular exatamente quantos reprodutores serão necessários para produzir determinada quantidade de animais de linhagem e sexo específicos, estabelecer a data de acasalamento e prever o desmame e o fornecimento).

As solicitações são enviadas por e-mail ou por formulário de solicitação de animais disponível no website do Biotério. O pesquisador deve fornecer as seguintes informações, que serão imprescindíveis para o início da programação: número do protocolo de aprovação no CEUA da FCF ou do IQ; modelo do animal; sexo; quantidade de animais; idade; utilização de sala experimental; tipo de gaiola (polipropileno, semimetabólica, metabólica ou *rack*

ventilado); quantidade de animal por gaiola que deverá manter até o final do ensaio; previsão de início e duração total do ensaio, inclusive a adaptação dos animais.

Após o recebimento das solicitações com todas essas informações, as chefias das seções de produção e experimentação devem fazer um planejamento do fornecimento dos animais sujeitos a disponibilidade de espaço nas salas experimentais, conforme os dados das solicitações e a disponibilidade de reprodutores para realizar os acasalamentos.

Terminado esse planejamento, o pesquisador receberá uma data de previsão de entrega dos animais para que possa programar o ensaio, providenciar reagentes e, em alguns casos, dietas específicas (Anexo 1).

## TRANSPORTE DE ANIMAIS

Os animais ficam estressados durante o transporte, o que altera sua fisiologia normal. Os cuidados a seguir devem ser tomados para minimizar esses problemas:

- ✓ O transporte de uma instalação a outra deve ser planejado com antecedência, para ser realizado no menor tempo possível e para que o animal fique protegido de condições ambientais extremas e traumas físicos;
- ✓ Verificar com antecedência se será necessário trazer gaiolas para buscar os animais;
- ✓ Confirmar antecipadamente com o Biotério qual será o horário de entrega dos animais;
- ✓ Evitar transportar muitos animais simultaneamente;
- ✓ Segurar a gaiola firmemente entre os braços e carregar uma por vez, para evitar quedas;
- ✓ No transporte por períodos prolongados, fornecer alimento e água de acordo com as necessidades dos animais;
- ✓ No transporte de uma sala para outra, devem ser retirados os bebedouros, a fim de não vazar água nas gaiolas, evitar trepidações e assegurar que estas estejam bem fechadas, para que não ocorram fugas;
- ✓ O transporte de organismos geneticamente modificados é regulamentado pela Instrução Normativa CTNBio nº 4, de 19 de dezembro de 1996[4];
- ✓ Os animais transferidos para o novo ambiente devem ser acomodados em gaiola adequada, com maravalha, água e ração, observando a densidade adequada de animais na gaiola;
- ✓ Por fim, aguardar o período de adaptação e aclimatação ao novo ambiente antes de iniciar qualquer procedimento com os animais.

**Transporte aéreo de animais vivos**

- ✓ O Biotério não é responsável pelo transporte dos animais. Será necessário contratar uma empresa que faz transporte de animais e providencie a documentação necessária para transporte de animais vivos. O Biotério fornece o atestado sanitário, que pode ser emitido por um veterinário privado, e é pré-requisito para a emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA). Esta deve ser emitida por veterinário cadastrado na Secretaria de Defesa Agropecuária do Estado, para realização de transporte intra e interestadual.

ANIMAIS DE LABORATÓRIO – deve ser emitido atestado de sanidade por médico veterinário do setor privado até 72 horas antes da emissão da GTA[5].

- ✓ O interessado deve providenciar gaiolas adequadas para transporte (gaiolas microisoladoras ou específica para transporte de animais). O número de gaiolas dependerá da quantidade de animais que pretende adquirir e do tamanho da gaiola. O Biotério orienta alojar cinco animais por gaiola. Se forem camundongos, podem ser alojados em gaiolas grandes utilizadas para ratos; nesse caso, manter no máximo 15 animais por gaiola.
- ✓ As gaiolas são transportadas sem bebedouro, para evitar vazamento de água e a consequente morte dos animais. Colocam-se gel hidratante especial ou maçãs cortadas para mantê-los hidratados durante o tempo entre o transporte e a chegada ao destino final (Biotério).
- ✓ O horário para retirada de animais, nesse caso, deve ser agendado com antecedência mínima de 48 horas e dentro do expediente do Biotério: das 7h às 11h ou das 13h às 15h30.
- ✓ O Biotério orienta que se reserve um voo direto, procurando um horário em que os animais fiquem o menor tempo possível aguardando o embarque.
- ✓ Após a chegada, os animais devem ser imediatamente levados para o Biotério, onde serão mantidos e transferidos para gaiola com água e ração *ad libitum*, permanecendo em adaptação ao novo ambiente por no mínimo uma semana antes de iniciar o ensaio biológico.

## PROCEDIMENTOS PARA ACESSO DE FUNCIONÁRIOS NA SEÇÃO

O acesso à seção de produção de ratos e camundongos é restrito aos funcionários do Biotério e pesquisadores que necessitarem de treinamento com agendamento prévio. Os funcionários da seção devem seguir os procedimentos descritos no POP (Anexo 8) cada vez

que tiverem acesso à seção.

Uma das barreiras sanitárias estabelecidas pelo Biotério é o banho de acesso. Em alguns biotérios, utiliza-se a cortina de ar em vez do banho.

## PROCEDIMENTOS PARA INTRODUÇÃO DE MATERIAIS NA SEÇÃO

### Autoclave

A seção dispõe de três autoclaves de dupla porta com capacidade aproximadamente 560 litros cada uma, onde os materiais (EPI, toalhas, caixas, tampas, maravalhas, bebedouros, fichas de registro, panos para limpeza e outros materiais) oriundos da seção de higiene e esterilização e previamente higienizados, devem ser esterilizados por autoclave.

### Materiais que não podem ser esterilizados por autoclave

Todo material a ser introduzido na seção de produção e que não pode ser esterilizado por autoclave deve ser descontaminado (Capítulo 5).

## ANIMAIS DE LABORATÓRIO

A utilização de animais na pesquisa já era conhecida há mais de 400 anos a.C., quando cientistas da época realizavam dissecções e necropsias em animais com a finalidade de constatar semelhanças e diferenças de formação e funcionamento de sistemas[6].

Diversos modelos animais são utilizados em pesquisa biomédica, e as espécies mais utilizadas são classificadas como convencionais. São os roedores: camundongo (*Mus musculus*), ratos (*Rattus norvegicus*), cobaia (*Cavia porcellus*), hamster (*Mesocrisetus auratus*) e o lagomorfo: coelho (*Oryctolagus cuniculus*).

### Características gerais de camundongos e ratos

**Camundongos** – têm sido utilizados pelo homem em pesquisa científica desde 1600, porém foram domesticados somente por volta de 1900, transformando-se em um dos mais

importantes animais de experimentação. Atualmente, são os animais de laboratório mais utilizados na pesquisa biomédica e em ensaios biológicos.

São modelos animais muito dóceis, de fácil manipulação, facilidade reprodutiva, curto ciclo de vida, pequenos e de fácil manutenção. Apresentam o fundo genético mais conhecido, tendo contribuído como ferramenta fundamental da manipulação genética[7] e possibilitado os estudos em diversas áreas da Ciência, como Nutrição, Genética, Imunologia, Farmacologia, Embriologia, entre outras.

A utilização de animais por tantos anos possibilitou o aparecimento de milhares de linhagens específicas para estudo de diversas doenças.

**Ratos** – o *Rattus norvegicus* foi o primeiro mamífero a ser domesticado para pesquisa, e a primeira colônia de criação de ratos foi estabelecida em 1856**.** Por ser maior que os camundongos, essa espécie é utilizada como modelo em estudos como transplante de órgãos e ósseo, diabetes, distúrbios psiquiátricos, estudos comportamentais, doenças cardiovasculares e cirurgia. Inteligentes e dóceis, são animais de fácil criação, manipulação e adaptação, sendo agressivos somente na defesa de seus filhotes[8].

## Parâmetros biológicos, fisiológicos e reprodutivos e consumo de alimentos

As principais características e os parâmetros biológicos, fisiológicos e de consumo de alimento de ratos e camundongos estão descritos nas Tabelas 1, 2 e 3.

O perfil do desenvolvimento de ratos e camundongos está presente na Tabela 4 e nas Figuras 2 e 3. A identificação do sexo de ratos e camundongos, neonatos e recém-desmamados está apresentada nas Figuras 4 e 5.

**Tabela 1.** Taxonomia de ratos e camundongos

| | **Rato** | **Camundongo** |
|---|---|---|
| **Classe** | Mamífera | Mamífera |
| **Ordem** | *Rodentia* | *Rodentia* |
| **Família** | *Muridae* | *Muridae* |
| **Gênero** | *Rattus* | *Mus* |
| **Espécie** | *Rattus norvegicus* | *Mus musculus* |

**Tabela 2.** Parâmetros biológicos, fisiológicos e reprodutivos[8,9]

| Parâmetros | Rato | Camundongo |
|---|---|---|
| Número de cromossomos | 42 (diploides) | 40 (diploides) |
| Temperatura corporal | 36-37,5 °C | 35,2-37,9 °C |
| Fórmula dentária | 2 (1/1 I, 0/0 C, 0/0 PM) e 3/3 M)=16 | 2 (1/1 I, 0/0 C, 0/0 PM) e 3/3 M)=16 |
| Início do consumo de alimento sólido | 14 dias | 12 dias |
| Peso ao nascer | 6-7 g | 1-2 g |
| Peso ao desmame | 45-60 g | 10-15 g |
| Peso adulto (macho) | 350-500 g | 25-50 g |
| Peso adulto (fêmea) | 250-350 g | 25-45 g |
| Adulto jovem (idade) | 8 semanas | 6 semanas |
| Idade reprodutiva | 8-10 semanas | 6-8 semanas |
| Final da idade reprodutiva | 10-12 meses | 8-10 meses |
| Ciclo estral | 4-5 dias | 4-5 dias |
| Duração do estro | 12 horas | 10-20 horas |
| Mecanismo de ovulação | Espontânea | Espontânea |
| Período de gestação | 20-22 dias | 19-21 dias |
| Idade do desmame | 21 dias | 19-28 dias |
| Mamas | 6 pares | 5 pares |

**Tabela 3.** Consumo de ração e água

| | Rato adulto | Camundongo adulto |
|---|---|---|
| **Água ingerida (mL)** | 10 a 20 mL/dia | 3 a 7 mL/dia |
| **Ração ingerida (g)** | 10 a 20 g/dia | 4 a 5 g/dia |

Fonte: Adaptado de *National Research Council*[10].

**Tabela 4.** Desenvolvimento de filhotes de camundongos e ratos*

| Idade (dias) | Camundongos | Ratos |
|---|---|---|
| Nascimento | Olhos fechados, cor vermelho--sangue, presença de leite no estômago, vibrissas, orelhas fechadas. Para animais *black*, a coloração é escura, e os machos apresentam ponto escuro entre o ânus e o aparelho genital | Olhos fechados, cor vermelho-sangue, presença de leite no estômago, vibrissas, orelhas fechadas. Para animais *black*, a coloração é escura |
| 1 | Pele rosada, leite no estômago, olhos e orelhas fechados | Pele rosada, leite no estômago, olhos e orelhas fechados |
| 2 | Pele rosa-claro, olhos e orelhas fechados. Animais *black* apresentam pele rosada, com tonalidade mais escura no dorso | Pele rosa-claro, olhos e orelhas fechados. Animais *black* apresentam pele rosada, com tonalidade mais escura no dorso |
| 3 | As orelhas começam a se descolar da cabeça | As orelhas começam a se descolar da cabeça |
| 4 | Metade da orelha é descolada da cabeça | Metade da orelha é descolada da cabeça |
| 5 | Animais albinos não apresentam coloração e animais *black* apresentam coloração mais definida | Animais albinos não apresentam coloração e animais *black* apresentam coloração mais definida |
| 6 | Os pelos começam a nascer como uma penugem no dorso | Os pelos começam a nascer como uma penugem no dorso |
| 7 | Presença de pelagem fina em maior quantidade na região dorsal | Presença de pelagem fina em maior quantidade na região dorsal |
| 8 | As mamas começam a ficar visíveis nas fêmeas de camundongos albinos, enquanto nos camundongos *black* as mamas ainda são invisíveis | As mamas ainda não podem ser visualizadas |
| 9 | Pelos mais fechados no dorso. Mamas visíveis em camundongos de coloração escura | Dentes incisivos inferiores visíveis e os incisivos superiores começam a apontar |
| 10 | Dentes incisivos inferiores visíveis | Idem ao dia 9 |
| 11 | Dentes incisivos superiores podem ser visualizados | As mamas ficam visíveis |
| 12 | As orelhas se abrem totalmente | As orelhas se abrem totalmente |
| 12-14 | Começam a consumir alimentos sólidos, mas a amamentação ainda é a principal fonte de alimentação | Começam a consumir alimentos sólidos, mas a amamentação ainda é a principal fonte de alimentação |
| 13-14 | Início da abertura dos olhos | Início da abertura dos olhos |

*Dados não publicados e obtidos no Biotério FCF-IQ/USP.

Figura 2. Perfil de desenvolvimento de camundongos. Dados não publicados e obtidos no Biotério FCF-IQ/USP

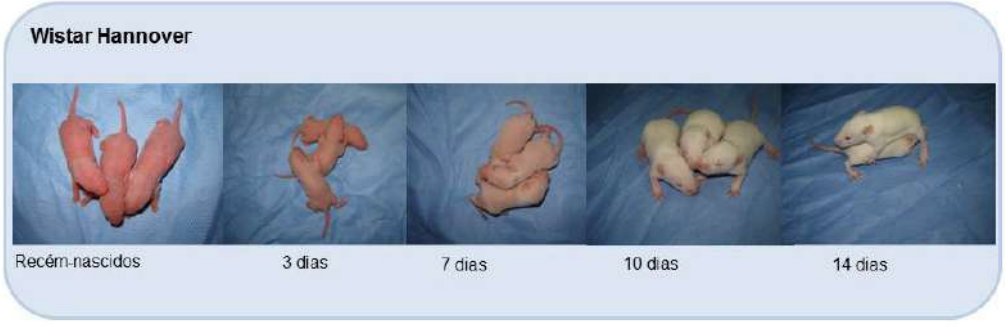



Figura 3. Perfil de desenvolvimento de ratos. Dados não publicados e obtidos no Biotério FCF-IQ/USP

## Sexagem de neonatos e recém-desmamados

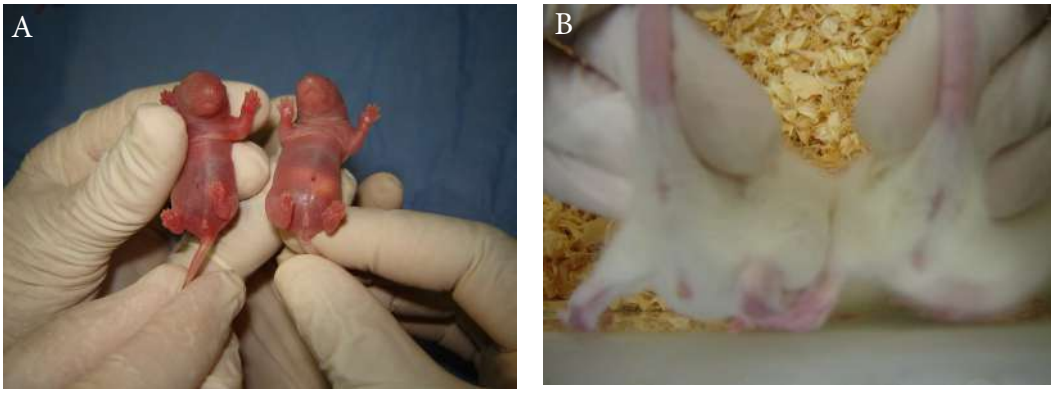



Figura 4. A) Neonatos de ratos com um dia de vida: macho à direita e fêmea à esquerda; B) Ratos recém-desmamados: macho à esquerda e fêmea à direita

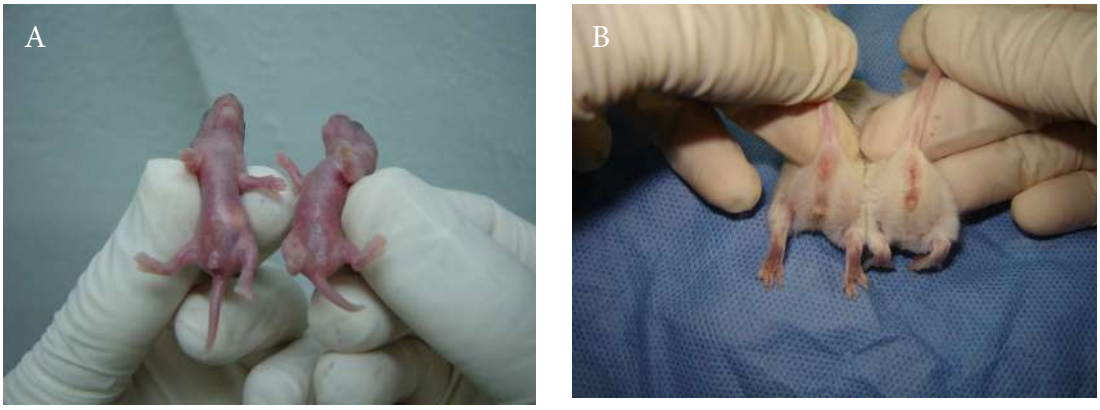



Figura 5. A) Neonatos de camundongos com um dia de vida: macho à esquerda e fêmea à direita; B) Camundongos recém-desmamados. : macho à esquerda e fêmea à direita

## AMBIENTE E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

### Macroambiente

As condições ideais para a manutenção de ratos e camundongos do Biotério são mantidas pelo sistema de ar condicionado central, que oferece ventilação e condicionamento do ar em temperatura e UR constantes (Capítulo 5). O balanceamento do ar nas salas de produção é mantido com pressão positiva em relação aos corredores, para evitar contaminação nas salas de produção. As salas são mantidas em temperatura de 22±2 °C e umidade relativa (UR) do ar em 50±10%. Os registros da temperatura e da UR são feitos diariamente e computados para garantir a estabilidade do sistema. No caso de qualquer alteração observada, o técnico de manutenção do sistema deve ser acionado.

As salas apresentam iluminação por lâmpadas fluorescentes, e os animais são mantidos em fotoperíodo de 12 h de claro por 12 h de escuro, controlado por um temporizador digital. O período de claro inicia às 6 h, e o de escuro, às 18 h.

### Microambiente)

Os ratos e camundongos do Biotério são mantidos em sistema convencional para biotério, gaiolas abertas (*Open Caging System*) ou gaiolas individualmente ventiladas – *Individually Ventilated Cage (IVC*).

Na seção de produção utilizam-se dois tipos de alojamento:

Sistema O*pen Cage* – os animais são criados em gaiolas confeccionadas em polipropileno, nas medidas 30 cm x 20 cm x 13 cm para camundongos e 49 cm x 34 cm

x 16 cm para ratos, com grade aramada em aço inoxidável, comedouro e encaixe para o bebedouro. São desprovidas de tampa-filtro e dispostas em estantes abertas. Nesse sistema o controle de temperatura, umidade e filtragem do ar é feito em toda a sala, não havendo controle microambiental. Cada gaiola é trocada duas vezes por semana.

Sistema *Individually Ventilated Cage* (I*VC*) – a ventilação é realizada em cada gaiola individualmente, proporcionando uma maior troca de ar e permitindo um maior intervalo entre as trocas das gaiolas. As gaiolas são confeccionadas em polisulfona, medindo 32 cm x 20 cm x 21 cm para camundongos, com grade aramada em aço inoxidável, comedouro e encaixe para o bebedouro. São dotadas de filtro microisolador, e a manipulação dos animais deve ser realizada em estação de troca, sendo as gaiolas trocadas uma vez por semana. Esse sistema foi desenvolvido com o intuito de melhorar a qualidade sanitária dos animais, evitando contaminação cruzada. As linhagens de camundongos geneticamente modificados são mantidas nesse sistema, que permite maior controle do padrão sanitário e promove a biossegurança dos animais e dos funcionários[2,3].

As gaiolas utilizadas no Biotério, para os dois sistemas de alojamento, seguem as recomendações descritas na Tabela 5 e permitem o alojamento de cinco animais por gaiola. Camundongos em estoque podem ser mantidos em gaiolas de ratos, sendo permitido o alojamento de no máximo 15 animais por gaiola.

**Tabela 5.** Espaço físico recomendado para roedores de laboratório

| Espécie | Peso (g) | Área do piso/animal (cm²) | Altura (cm) |
|---|---|---|---|
| **Rato** | | | |
| | < 100 | 109,65 | 45,15 |
| | Até 200 | 148,35 | 45,15 |
| | Até 300 | 187,05 | 45,15 |
| | Até 400 | 258 | 45,15 |
| | Até 500 | 387 | 45,15 |
| | > 500 | ≥ 451,5 | 45,15 |
| **Camundongo** | | | |
| | < 10 | 38,7 | 32,25 |
| | Até 15 | 51,6 | 32,25 |
| | Até 25 | 77,4 | 32,25 |
| | > 25 | ≥ 96,75 | 32,25 |

Fonte: Adaptado de *National Research Council*[10].

## REPRODUÇÃO

O sucesso na reprodução de ratos e camundongos está relacionado com o conhecimento das características específicas de cada modelo animal e com a influência de diversos fatores, como ambiente, nutrição e comportamento. Esses fatores são controlados com a implantação de procedimentos adequados na seção.

A produção dos animais é planejada para atender às solicitações dos pesquisadores, respeitando o espaço físico disponível para essa finalidade, para evitar acasalamentos desnecessários e minimizar a produção de animais excedentes.

### *Status* genético

Os sistemas de reprodução de ratos e camundongos são estabelecidos de acordo com as características genéticas dos modelos animais.

Os animais produzidos no Biotério podem ser classificados, quanto a seu *status* genético, como: isogênicos *(inbred)*, heterogênicos (*outbred*), mutantes espontâneos e geneticamente modificados.

**Animais heterogênicos** – apresentam alta heterozigosidade, são geneticamente variáveis e mantidos de maneira que se evite ao máximo a consanguinidade e se preserve a variabilidade genética.

**Animais isogênicos** – são linhagens geneticamente definidas com alta consanguinidade e 99% de homozigose. Trata-se de animais com menor desempenho reprodutivo se comparados com os animais heterogênicos. Também apresentam maior suscetibilidade a doenças.

**Mutantes espontâneos** – são modelos estabelecidos com base em uma mutação espontânea ocorrida em uma colônia e que tenha apresentado interesse para a Ciência. A partir dessa mutação os acasalamentos são direcionados de acordo com o gene de interesse.

**Animais geneticamente modificados** – são organismos que foram artificialmente manipulados por introdução, modificação ou deleção de um gene, alterando todas as células do organismo, inclusive as germinativas, permitindo que a modificação genética seja transmitida aos seus descendentes[11]. Podem ser classificados em diferentes tipos de animais: transgênicos por adição, modelos *knockout* (gene inativado) e modelos *knockin* (gene previamente modificado ou substituído).

O Biotério produz atualmente 12 modelos de ratos e camundongos, que estão descritos

a seguir, e para cada modelo animal são estabelecidas as respectivas colônias de fundação. Quando a quantidade de animais produzida não é suficiente para fornecer animais para pesquisa, uma ou mais colônias de produção podem ser estabelecidas[12].

## Manutenção de colônias de ratos e camundongos heterogênicos

### a) Colônia de fundação

É a colônia estabelecida para perpetuar uma linhagem (Anexo 13).

A colônia de fundação deve ser mantida apenas por meio de acasalamento entre indivíduos não consanguíneos. Para garantir a diversidade genética, utiliza-se um sistema descrito por Poiley[10], que distribui os casais em grupos; assim, os acasalamentos são feitos entre indivíduos de grupos diferentes. Nesse sistema devem ser mantidos no mínimo 25 casais divididos em no mínimo cinco grupos. Para formar os casais, devem-se selecionar um macho de um grupo e uma fêmea de um grupo diferente, sendo que esse casal pertencerá a um novo grupo, conforme descrito na Tabela 6[13,14]. Posteriormente, os novos grupos formados são acasalados de acordo com o mesmo sistema apresentado na Tabela.

**Tabela 6.** Sistema de acasalamento para animais heterogênicos

| Macho | | Fêmea | | Novo grupo a formar |
|---|---|---|---|---|
| B | + | C | = | A |
| C | + | D | = | B |
| D | + | E | = | C |
| E | + | A | = | D |
| A | + | B | = | E |

O método de acasalamento utilizado nesse tipo de colônia é o monogâmico intensivo, em que um macho é mantido com uma única fêmea durante toda a vida reprodutiva. Com esse método de acasalamento, é possível aproveitar o cio pós-parto e, assim, a fêmea é capaz de gerar uma ninhada ao mesmo tempo que amamenta outra.

Esses casais devem ser renovados a cada seis a oito meses após a data de acasalamento, em razão da idade avançada dos reprodutores, que já não apresentam mais o mesmo desempenho reprodutivo.

No momento da renovação da colônia, é importante reservar filhotes de todos os casais e de todos os grupos, para ampliar a diversidade genética.

No desmame, as fichas de registro devem ter as seguintes informações: espécie, linhagem, data de nascimento, data de desmame, número e sexo dos animais e, principalmente, número dos pais e identificação do grupo a que pertence.

**b) Colônia de expansão**

Colônia estabelecida para aumentar a produção e fornecer animais para pesquisa, podendo ser feita em sistema monogâmico ou poligâmico.

A expansão de colônias heterogênicas deve ser feita somente quando a demanda de animais é muito grande e a colônia fundadora não tem condições de produzir todos os animais necessários para reprodução e pesquisa. Nesse caso, é utilizado o sistema de acasalamento programado.

**c) Acasalamento programado**

O acasalamento programado é utilizado com a finalidade de sincronizar os nascimentos e, consequentemente, os desmames, para fornecimento programado de animais com peso e idade uniformes, produzindo o mínimo de animais excedentes. Nesse sistema é feito um acasalamento poligâmico na proporção de um macho para três fêmeas, que são mantidos juntos durante cinco dias (duração do ciclo estral). O macho é separado das fêmeas após o quinto dia, e as fêmeas são mantidas em gaiolas individuais assim que for constatada a prenhez. No desmame, aos 21 dias de idade, todos os filhotes são pesados e selecionados para que sejam fornecidos com peso homogêneo (Anexo 14).

## Manutenção de colônias de ratos e camundongos isogênicos

**a) Colônia de fundação** – o estabelecimento da colônia fundadora é fundamental para conservar as características genéticas da linhagem. Essa colônia deve ser composta de no mínimo cinco casais, formados exclusivamente entre irmã e irmão em sistema monogâmico intensivo. A perpetuação da linhagem deve ser feita a partir de um único casal que apresentar melhor desempenho reprodutivo. Os filhotes desse casal devem ser reservados para substituir os casais dessa colônia no momento da renovação. Esses casais devem ser renovados a cada seis a oito meses após a data de acasalamento, em razão da idade avançada dos reprodutores.

Os dados de reprodução da colônia de fundação são criteriosamente registrados por meio de mapas que possam mostrar o perfil de seus antecessores a cada geração (Anexo 12).

No desmame, as fichas de registro devem ter as seguintes informações: espécie, linhagem, data de nascimento, data de desmame, número e sexo dos animais e, principalmente, número dos pais.

**b) Colônia de expansão** – a colônia de expansão é formada por filhotes provenientes da colônia de fundação que não serão utilizados como fundadores. Deve ser mantida por meio de acasalamentos entre irmãos ou primos, se necessário.

O número de casais dependerá da demanda de cada linhagem, e os acasalamentos são mantidos em sistema poligâmico intensivo (harém mantido durante toda a vida reprodutiva) na proporção de um macho para duas fêmeas. Esses casais devem ser renovados a cada seis a oito meses após a data de acasalamento, em razão da idade avançada dos reprodutores. Os filhotes desses casais são destinados exclusivamente à pesquisa.

## Acasalamentos para obtenção de embrião

Para obter embriões em dias específicos, faz-se a sincronização do estro nos camundongos utilizando a interferência do hormônio denominado feromônio, que é secretado pelas glândulas prepuciais e liberado na urina do macho, também conhecido como efeito Whitten[9] (Capítulo 3). Assim, é possível obter uma fecundação controlada. Para realizar a sincronização do estro, as fêmeas são expostas a uma gaiola com uma cama suja do macho por três dias antes do acasalamento. Após esse período, as fêmeas são agrupadas com o macho correspondente àquela gaiola. A confirmação da cópula se dá por meio da observação do tampão vaginal (sêmen solidificado que tampona o canal vaginal das fêmeas) (Figura 6).

Como são animais de hábitos noturnos, é recomendado acasalá-los próximo do período escuro, sendo possível observar o tampão nas fêmeas já na manhã do dia seguinte ao acasalamento. A partir desse dia conta-se como E0 (embrião de 0 dia).

Figura 6. Tampão vaginal em fêmea de camundongo

## Descrição dos modelos de animais produzidos no Biotério

O Biotério produz 12 modelos diferentes de animais, sendo oito de camundongos e quatro de ratos sanitária e geneticamente definidos. A seguir está apresentada a descrição de cada um dos modelos.

### Animais heterogênicos (*outbred*) produzidos no Biotério

| **Espécie: camundongo**<br>***Stock*: Swiss Webster** | **Nomenclatura:**<br>**NTacFcfIq:SW** |
|---|---|

Características

Camundongo heterogênico (*outbred*) utilizado há décadas em pesquisas biomédicas, principalmente em Farmacologia.

Representa populações naturais, excelente desempenho reprodutivo, com alta fertilidade, prolificidade e produtividade.

Adquirido em 2001 – Taconic, Germantown, (www.taconic.com)[15]

Origem: Carworth Farm, 1935.

Cor: albino.

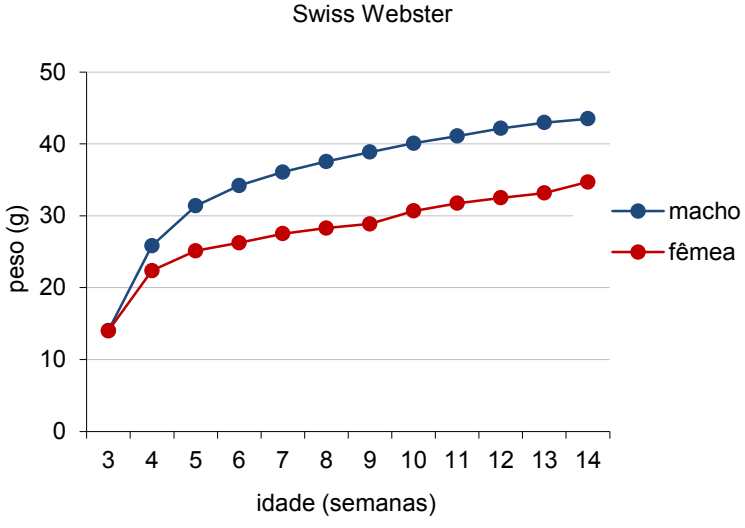
Peso médio ao desmame (21 dias de idade): 13 g.

Peso médio do adulto jovem (6 semanas): macho: 30 g; fêmea: 25 g.

Peso médio do adulto (8 semanas): macho: 40 g; fêmea: 30 g.

Sistema de acasalamento: Poiley.

Curva de peso (Biotério FCF-IQ/USP)



| | |
|---|---|
| **Espécie: rato**<br>***Stock*: Wistar Hannover** | **Nomenclatura:**<br>**HanTacFcfIq: WH** |

Características

Rato heterogênico (*outbred*) frequentemente utilizado como modelo de toxicologia e em pesquisas biomédicas em geral e em estudos de comportamento.

Adquirido em 2001 – Taconic, Germantown, USA.

Origem: Donaldson, 1906 – Wistar Institute, USA.

Cor: albino.

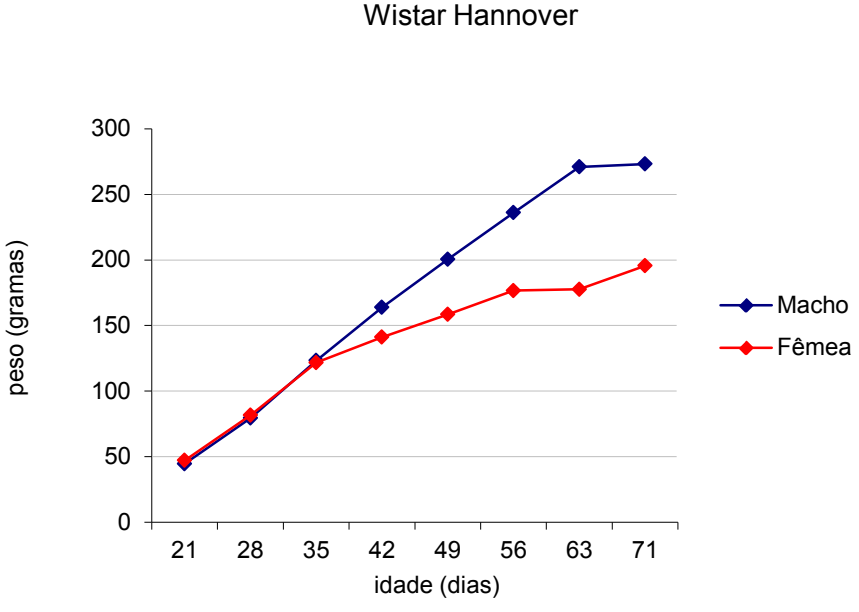
Peso médio ao desmame (21 dias de idade): 45-50 g.

Peso médio do adulto jovem (8 semanas): macho: 250 g; fêmea: 200 g.

Peso médio do adulto (10 semanas): Macho: 400 g; Fêmea: 250 g.

Sistema de acasalamento: Poiley.

Curva de peso (Biotério FCF-IQ/USP)



| Espécie: rato | Nomenclatura: |
|---|---|
| ***Stock*: Sprague Dawley** | **NTacFcflq: SD** |

Características

Modelo heterogênico (*outbred*) utilizado principalmente em pesquisas biomédicas relacionadas à toxicologia e à farmacologia. Linhagem suscetível a tumores de mama.

Adquirido em 2001 – Taconic, Germantown, USA.

Origem: Worthington Dawley, 1925. Mantido na Sprague Dawley Farm, USA.

Cor: albino.

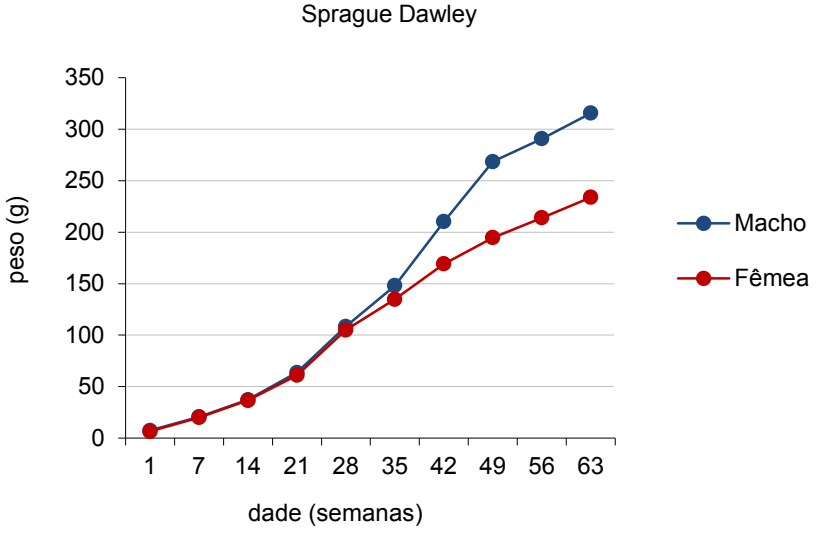
Peso médio ao desmame (21 dias de idade): 55-60 g.

Peso médio do adulto jovem (8 semanas): macho: 340 g; fêmea: 180 g.

Peso médio do adulto (10 semanas): macho: 500 g; fêmea: 280 g.

Sistema de acasalamento: Poiley.

Curva de peso (Biotério FCF-IQ/USP)



| **Espécie: rato** | **Nomenclatura:** |
|---|---|
| ***Stock*: NIH (Nude)** | **NTacFcflq: NIH-*Whn*** |

Características

Modelo heterogênico (*outbred*) imunodeficiente. Mutante espontâneo, também conhecido com rato *Nude*.

Adquirido em 2001 – Taconic, Germantown, USA.

Origem: desenvolvido por NIH em 1979-1980 por meio de intercruzamento entre linhagens.

Cor: albino e black.

Os homozigotos tornam-se *hairless* com 3-4 semanas de idade; logo depois, podem apresentar pelos curtos na cabeça e ocasionalmente no resto do corpo.

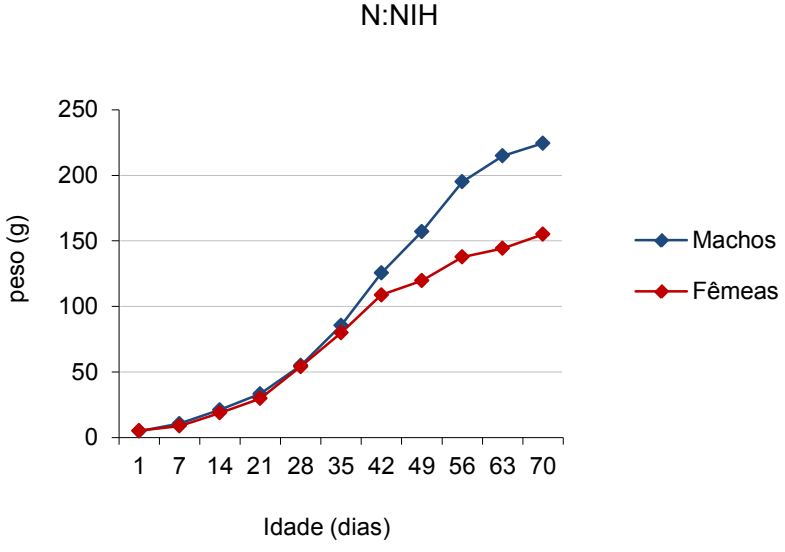
Peso médio ao desmame (28 dias de idade): 45-50 g.

Peso médio do adulto jovem (8 semanas): macho: 230 g; fêmea: 140 g.

Peso médio do adulto (10 semanas): macho: 300 g; fêmea: 180 g.

Sistema de acasalamento: rotacional. São acasalados machos homozigotos com fêmeas heterozigotas.

Curva de peso (Biotério FCF-IQ/USP)



**Animais isogênicos (*inbred*) produzidos no Biotério**

| | |
|---|---|
| **Espécie: camundongo**<br>**Linhagem: BALB/c** | **Nomenclatura:**<br>**BALB/c/AnNTacFcfIq** |

Características

Camundongo isogênico *(inbred*) utilizado principalmente em imunologia, produção de anticorpos monoclonais, farmacologia e toxicologia.

Adquirido em 2001 – Taconic, Germantown, USA.

Origem: Bagg et al., 1923.

Cor: albino.

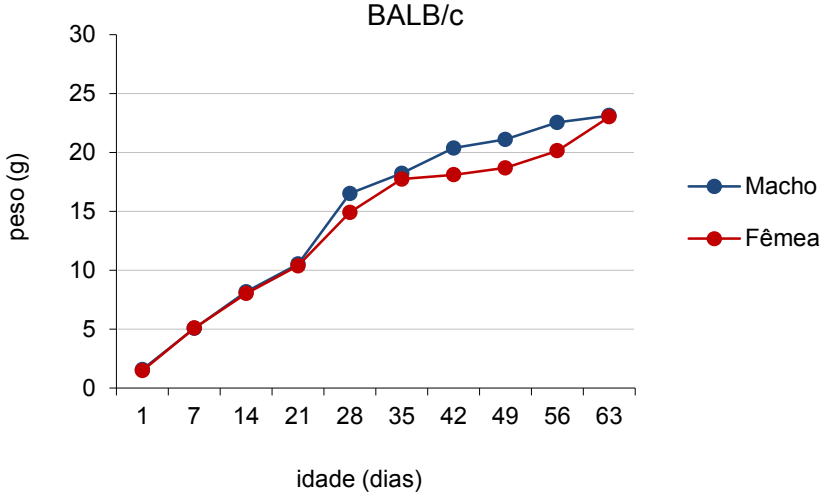
Peso médio ao desmame (21 dias de idade): 11 g.

Peso médio do adulto jovem (6 semanas): macho: 21 g; fêmea: 17 g.

Peso médio do adulto (8 semanas): macho: 24 g; fêmea: 20 g.

Sistema de acasalamento: acasalamento entre irmã e irmão em sistema monogâmico intensivo.

Curva de peso (Biotério FCF/IQ-USP)



| | |
|---|---|
| **Espécie: camundongo**<br>**Linhagem: C57BL/6** | **Nomenclatura:**<br>**C57BL/6/NTacFcfIq** |

Características

Camundongo isogênico (*inbred*) usado em imunologia, oncologia e toxicologia. Também é amplamente utilizado como *background* para camundongos transgênicos e mutantes.

Adquirido em 2001 – Taconic, Germantown, USA.

Origem: Little, 1921.

Cor: *black*.

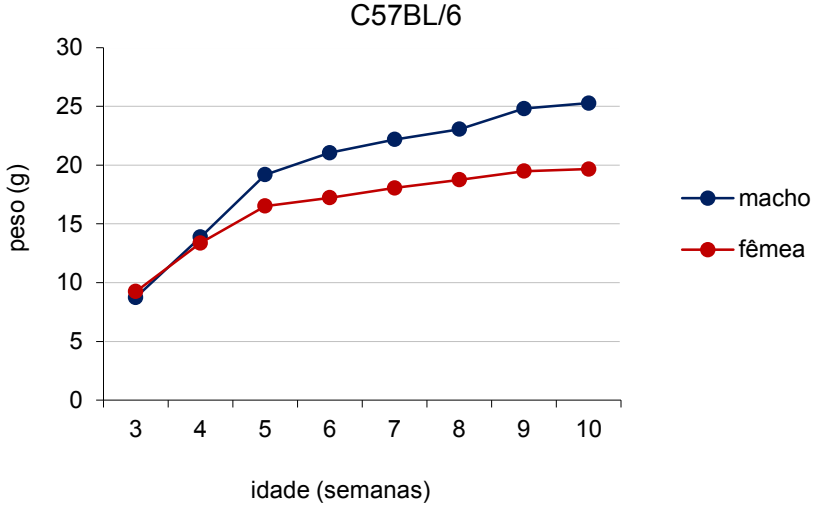
Peso médio ao desmame (21 dias de idade): 9 g.

Peso médio do adulto jovem (6 semanas): macho: 19 g; fêmea: 17 g.

Peso médio do adulto (8 semanas): macho: 25 g; fêmea: 21 g.

Sistema de acasalamento: acasalamento entre irmã e irmão em sistema monogâmico intensivo.

Curva de peso (Biotério FCF-IQ/USP)



| | |
|---|---|
| **Espécie: camundongo**<br>**Linhagem: BALB/c NUDE** | **Nomenclatura:**<br>**C.Cg-Foxn1$^{nu}$/AnNTacFcfIq** |

Características

Mutante espontâneo *inbred*, deficiente em células-T (imunodeficiente).

*Backcrossed* com BALB/c por nove gerações.

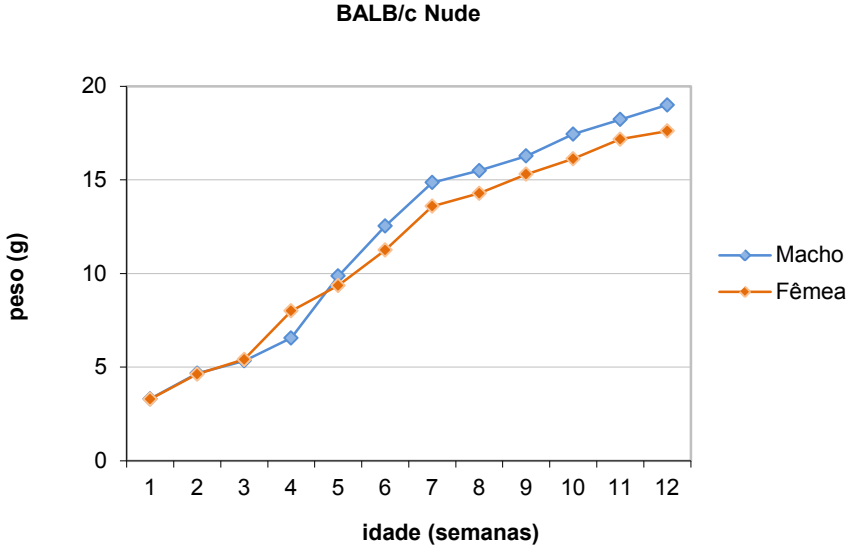
Adquirido em 2001 – Taconic, Germantown, USA.

Cor: albino.

Homozigotos: *Hairless*.

Sistema de acasalamento: acasalamento entre irmã e irmão em sistema monogâmico intensivo. São acasalados machos homozigotos com fêmeas heterozigotas.

Curva de peso (Biotério FCF/IQ-USP)



| | |
|---|---|
| **Espécie: camundongo**<br>**Linhagem: *Hairless*** | **Nomenclatura:**<br>**HRS-*hr*/+/J** |

Características

Mutante espontâneo da linhagem BALB/c mantido como colônia *inbred*.

Modelo utilizado principalmente em dermatologia e oncologia.

Adquirido em 2002 – The Jackson Laboratory (www.criver.com)[16]

Origem: London, 1924.

Cor: albino.

Homozigotos: pelagem normal até 10 dias de idade. Tornam-se *hairless* após algumas semanas.

Sistema de acasalamento: acasalamento entre irmã e irmão em sistema monogâmico intensivo. São acasalados machos homozigotos com fêmeas heterozigotas.

**Modelos geneticamente modificados produzidos no Biotério**

| | |
|---|---|
| **Espécie: camundongo**<br>**Linhagem: KO-Ldl** | **Nomenclatura:**<br>**B6.129S7-Ldlr$^{tm1Her}$/JFm** |

Características

Camundongo homozigoto para a mutação Ldlr$^{tm1Her}$ que apresenta elevado nível de colesterol (de 200-400 mg/dl), que é bastante alterado (> 2,000 mg/dl) quando os animais recebem dieta rica em gordura.

Modelo para pesquisa cardiovascular (hipercolesterolemia), de diabetes e obesidade, metabolismo (lipídios) e genes homólogos em camundongos/humanos.

Linhagem 129 *backcrossed* com C57BL/6 por dez gerações.

Adquirido em 2005 – Faculdade de Medicina/USP.

Cor: *Black.*

Sistema de acasalamento: são acasalados entre irmãos (*inbred*), uma vez que o gene de interesse está em homozigose, mantidos em acasalamento monogâmico intensivo.

| **Espécie: camundongo**<br>**Linhagem: P2-GFP** | **Nomenclatura:**<br>**Olfr17$^{tm7Mom}$/MomJ** |
|---|---|

Características

Camundongo *knockout* que expressa proteína GFP no epitélio olfatório.

Linhagem FVB/N *backcrossed* com C57BL/6 por quatro gerações.

Adquirido em 2008 – The Jackson Laboratory.

Origem: Peter Mombaerts, Max Plank Institute of Biophysics, The Rockefeller University.

Cor: *black*, *agouti*, chinchila, marrom e albino.

Sistema de acasalamento: os filhotes podem nascer com três variações diferentes do gene: homozigotos 17 (sem gene modificado – animal de controle), heterozigoto (um alelo mutante e um normal) e homozigoto GFP (dois alelos mutantes). Como não apresentam fenótipo que possa identificá-los, é necessário genotipar os animais logo após o desmame, com 3-4 semanas de idade.

São acasalados entre irmãos (*inbred*) apenas os animais heterozigotos, mantidos em acasalamento monogâmico intensivo.

Particularidades da linhagem (Anexo 16).

| **Espécie: camundongo**<br>**Linhagem: F8-Kaz** | **Nomenclatura:**<br>**B6;129S4-F8$^{tm1Kaz}$/J** |
|---|---|

Características

Camundongo geneticamente modificado. Modelo para hemofilia A (Fator VIII).

Adquirido em 2009 – The Jackson Laboratory.

Origem: Haig Kazazian, Jr., University of Pennsylvania.

Cor: *agouti*.

Sistema de acasalamento: são acasalados entre irmãos (*inbred*) em sistema de acasalamento monogâmico intensivo, uma vez que o gene de interesse está em homozigose.

| | |
|---|---|
| **Espécie: rato** | **Nomenclatura** |
| **Linhagem: SOD1-ALS** | **NTacFcflq:SD-Tg (SOD1G93A)L26H** |

Características

Modelo transgênico microinjetado – modelo para *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (ALS).

Adquirido em 2007 – Taconic, Germantown, USA.

Origem: Desenvolvido por John Kulik at Wyeth.

Cor: albino.

Peso médio ao desmame (21 dias de idade): 55-60 g.

Peso médio do adulto jovem (8 semanas): macho: 340 g; fêmea: 180 g.

Sistema de acasalamento: mantidos acasalamentos entre machos SOD1 ALS positivos e fêmeas SD – *wild* (selvagens).

Particularidades da linhagem (Anexo 15)

**Controles sanitário, genético e nutricional**

**Controle sanitário**

Periodicamente uma amostragem de cada colônia ou linhagem do Biotério de Produção é submetida a exames parasitológicos, bacteriológicos e virológicos, com a finalidade de certificar o *status* sanitário dos animais.

Esses exames são realizados com a colaboração e a disponibilidade do laboratório de parasitologia e do laboratório de bacteriologia do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas/USP.

**Controle genético**

A monitoração genética começa com a manutenção adequada das colônias fundadoras, respeitando as particularidades genéticas de cada modelo animal. A fim de certificar que as características genéticas das linhagens estão sendo preservadas, utiliza-se uma técnica molecular com marcadores microssatélites que são identificados por reação de PCR (*Polymerase Chain Reation*). Esse controle genético é realizado com a colaboração e a disponibilidade do laboratório do Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas/USP.

**Controle nutricional**

O controle da ração oferecida para os roedores é realizado com o apoio do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP e da Central Analítica do IQ/USP. Algumas análises são realizadas em laboratórios particulares (Capítulo 7).

## REFERÊNCIAS


1. Hardy P. Gnotobiology and breeding techniques. In: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P. The handbook of experimental animals: the laboratory mouse. USA: Elsevier Academic Press; 2004. p.409-33.
2. Neves SMP, Chaguri LCAG, Fontes RS, Ong FM. Biossegurança em biotérios. In: Hirata MH, Hirata RDC, Filho JM. Manual de biossegurança. 2a ed. São Paulo: Manole; 2012. p.193-211.
3. Nascimento N, Neves SP. Procedimentos de biossegurança. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p.661-73.
4. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança [citado 20 set. 2012]. Disponível em: http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3501.html.
5. Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo [citado 20 set. 2012]. Disponível em: http://www.cda.sp.gov.br/www/servicos/index.php?action=view&cod=21.
6. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa: Ontario; 1996. v.1-2.
7. Dixon AK. The social behavior of mice and its sensory control. In: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P. The handbook of experimental animals: the laboratory mouse. USA: Elsevier Academic Press; 2004. p. 287-99.
8. Koolhaas JM. The laboratory rat. In: Poole T. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 7th ed. British: Blackwell Science; 2006. v.1, p. 313-30.
9. Baumans V. The Laboratory mouse. In: Poole T. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 7th ed. British: Blackwell Science, 2006. v.1, p.282-312.
10. National Research Council. Guide for care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington: The National Academies Press; 2011. 248p. Available from: http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf.
11. Fukamizu A. Transgenic animals in endocrinological investigation. J Endocrinol Invest. 1993;16(6):461-73.
12. Hardy P. Gnotobiology and breeding techniques. In: Hedrich H, Bullock G, Petrusz P. The handbook of experimental animals: the laboratory mouse. USA: Elsevier Academic Press; 2004. p.409-33.
13. Poiley S. A systematic method of breeder rotation for non-inbred laboratory animal colonies. Proc Anim Care Panel. 1960;10:159-66.

14. Lohmiller J, Swing SP. Reproduction and breeding. In: Suckow MA, Weisbroth ST, Franklin CL. The laboratory rat. USA: Elsevier Academic Press; 2006. p.147-64.

15. Taconic Laboratory. Available from: http://www.taconic.com.

16. Charles River Laboratory. Available from: http//www.criver.com.

Capítulo 5

# Seção de Higiene e Esterilização

**Roseni de Oliveira Santana**

**Lívia Duarte Rodrigues**

Introdução

Procedimentos para acesso à seção

Recebimento e processamento de materiais

- Caixas (gaiolas)
- Bebedouros
- Tampas e grades
- Uniformes
- Resíduos

Recebimento de material contaminado da seção de experimentação

Higienização de materiais

Esterilização e desinfecção

- Autoclaves e processos de desinfecção
- Controles

Sistema de ar condicionado

Manutenção de equipamentos

- Autoclaves
- Sistema de ar condicionado
- Máquina de lavar materiais
- Manutenção predial

Salas de estoque

- Almoxarifado
- Sala de estoque de ração
- Contêiner de estoque de maravalha

Descarte de resíduos

Câmara de $CO_2$ para eutanásia

Referências

## INTRODUÇÃO

A seção de higiene e esterilização do Biotério é responsável: pela higienização, desinfecção e esterilização de todo o material sujo produzido no Biotério; pelo controle do almoxarifado e pelo abastecimento de materiais para as outras seções; pela lavanderia; pela eutanásia dos animais; pelo descarte dos resíduos biológicos; e pelo acompanhamento das equipes técnicas de manutenção dos equipamentos.

A equipe é composta de três auxiliares e uma técnica que atua como chefe da seção. Todos são treinados para executar suas funções de acordo com as normas de boas práticas de laboratório (BPL)[1] e biossegurança[2], obedecendo aos documentos de POPs e participando constantemente de cursos e palestras.

A seção de higiene e esterilização está localizada no centro do Biotério, comunicando-se com as demais seções através das antecâmaras e autoclaves de barreira (Capítulo 1 – Figura 2). A antecâmara é o local por onde sai todo o material sujo, bem como animais que serão submetidos a eutanásia, entre outros materiais e equipamentos. Através das autoclaves, os materiais higienizados são esterilizados e devolvidos às seções de experimentação e produção.

Todo o equipamento de apoio, como tanques, máquina de lavar gaiolas, lavadora ultrassônica e autoclaves, está localizado no centro da seção de higiene e esterilização, interligado por dois corredores de acesso às seções de produção e experimentação. Nessa área existem as seguintes salas de apoio: almoxarifado, sala de estoque de ração e contêiner de estoque de maravalha.

A ventilação do Biotério é realizada pelo sistema de ar condicionado central, que atende as três seções (higiene, produção e experimentação).

## PROCEDIMENTOS PARA ACESSO À SEÇÃO

Assim que o técnico chega ao Biotério, dirige-se imediatamente aos vestiários, onde guarda no armário seus acessórios pessoais, retira sua vestimenta e paramenta-se com os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs): macacão, touca, máscara, luvas e sapato fechado à prova d'água. Realizados esses procedimentos, ele já está pronto para executar suas atividades (Figura 1).

Além dos EPIs citados, há a necessidade do uso de outros EPIs durante o manuseio de autoclaves, máquina de lavar materiais e na raspagem das caixas sujas, como: máscara protetora facial, luva térmica, óculos de proteção, luvas de látex (Mucambo), avental de PVC, máscara respiratória contra vapores orgânicos e ácidos e protetor auricular (concha ou *plug*).

Figura 1. Funcionário devidamente paramentado com EPIs

## RECEBIMENTO E PROCESSAMENTO DE MATERIAIS

Os técnicos das seções de experimentação e produção, bem como os pesquisadores que utilizam a seção de experimentação, ao longo do dia depositam nas antecâmaras materiais sujos, como gaiolas com maravalha e bebedouros. Esses materiais são recolhidos constantemente pelos técnicos da seção de higiene e esterilização para o adequado processamento.

Os materiais resistentes à alta temperatura (gaiolas, grades, bebedouros, componentes de gaiolas de *rack* ventilado, gaiolas de gaioleiro metabólico, itens de enriquecimento ambiental) são higienizados em máquina apropriada antes de serem esterilizados nas autoclaves.

### Caixas (gaiolas)

O Biotério conta com diferentes tipos de gaiolas (Figura 2):

- ✓ Gaiolas abertas (sistema *open cage*). São feitas de polipropileno, plástico translúcido ou opaco que é resistente ao calor intenso de até 121 ºC, podendo, portanto, ser autoclavadas;

- ✓ Gaiolas dos *racks* ventilados (sistema IVC) confeccionadas em polisulfona ou policarbonato, materiais de vida útil longa e grande resistência à autoclavagem de até 121 ºC (o policarbonato é mais resistente a queda e a polisulfona é mais resistente a alta temperatura);
- ✓ Gaiolas metabólicas e semimetabólicas confeccionadas em policarbonato ou aço inoxidável;
- ✓ Gaiolas para coelhos confeccionadas em polietileno (conchas) com módulos em ferro.

As caixas sujas são retiradas das antecâmaras e levadas pelos técnicos da seção de higiene e esterilização para serem submetidas ao processo de raspagem dos resíduos biológicos (maravalha, fezes, urina).

Após a retirada dos resíduos, as gaiolas são higienizadas na máquina de lavar materiais, sendo, no final do processo, organizadas em pilhas, para, posteriormente, serem autoclavadas e devolvidas às seções de experimentação e produção.

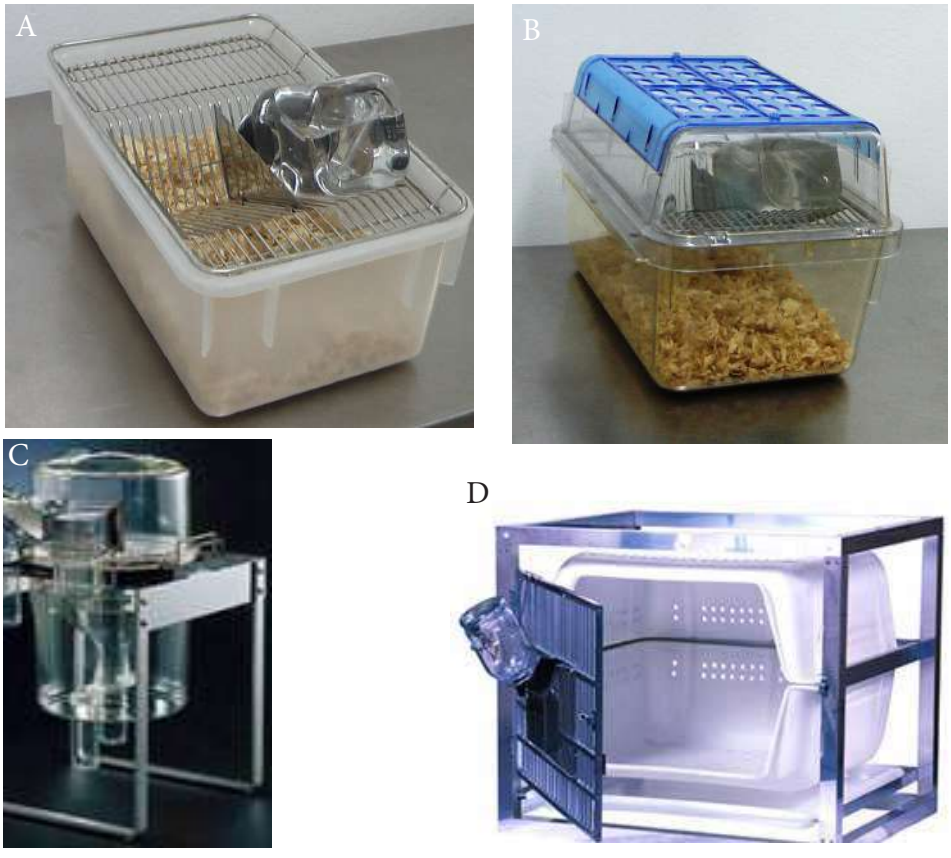



Figura 2. A) Gaiola de polipropileno; B) Gaiola de *rack* ventilado; C) Gaiola metabólica para ratos. Fonte: Disponível em: http://www.instrulab.com.br/produtos/32.jpg; D) Gaiola para coelhos. Fonte: Disponível em: http://www.beira-mar.com/mpead.htm

## Bebedouros

Os bebedouros são feitos de policarbonato ou polipropileno. Esses materiais são transparentes e resistentes a quedas e, formato que permite observar melhor as sujidades e o nível de água.

Os bebedouros sujos retirados das seções de experimentação e produção são recolhidos das antecâmaras pelos técnicos da seção.

Nessa seção, eles são esvaziados e colocados em um suporte apropriado para passarem pelo processo de higienização na máquina apropriada para lavar esses materiais.

Os bicos de aço inoxidável dos bebedouros são retirados e devidamente higienizados na lavadora ultrassônica para bicos (Figura 3). Após a higienização, os bebedouros são preenchidos com água filtrada e os bicos de aço inoxidável são recolocados. Posteriormente, os bebedouros tampados são dispostos em carrinhos próprios para esterilização e encaminhados para as respectivas seções através das autoclaves.

Os carrinhos próprios para a coleta de bebedouros sujos retornam para as respectivas seções através das antecâmaras, sendo previamente desinfetados com álcool 70%.

Figura 3. Lavadora ultrassônica para bicos de aço inoxidável

## Tampas e grades

As gaiolas dos *racks* ventilados apresentam tampas-filtro e acessórios feitos de

policarbonato. Por baixo da tampa-filtro, coloca-se a grade de aço inoxidável, que se encaixa na gaiola e contém as divisórias para colocação de ração e bebedouro. Já as caixas para manutenção de animais em sistema aberto (*open cage*), feitas em polipropileno, dispõem somente da grade de aço inoxidável com as divisórias.

Para realizar a higienização desses materiais, os filtros são retirados das tampas, sendo estas higienizadas junto com os acessórios na máquina de lavar materiais, assim como as grades de aço inoxidável. Posteriormente, os filtros são recolocados nas tampas ou substituídos por novos e esterilizados junto com as grades por meio do processo de autoclavagem.

## Uniformes

Cada seção dispõe de um carrinho próprio para coleta de uniformes (aventais e macacões) e toalhas sujos. Diariamente os uniformes são coletados pelos técnicos dessa seção e encaminhados para o setor de lavanderia. Além destes, todos os panos ou flanelas utilizados na limpeza de superfícies (piso, paredes, teto, bancadas) do Biotério são enviados para a lavanderia. Após higienização nas lavadoras, os vestuários limpos e úmidos passam por secagem a 80 $^{o}$C por 1h30. Quando secos, são devidamente dobrados, separados por tipo, acondicionados em embalagens próprias e autoclavados a 121 $^{o}$C por 35 min.

## Resíduos

Os resíduos retirados durante a raspagem das gaiolas, o lixo proveniente das salas de experimentação, das salas de animais, das seções de produção e de higiene e esterilização, bem como as carcaças de animais, são considerados resíduos de risco biológico (Figura 4).

Figura 4. Símbolo de risco biológico

Por medida de segurança[2], o resíduo proveniente da seção de experimentação, se

considerado contaminado, passa por processo de esterilização em autoclave antes do descarte.

Antes do descarte, os técnicos dessa seção acondicionam esses resíduos em sacos brancos identificados com símbolo de risco biológico.

## RECEBIMENTO DE MATERIAL CONTAMINADO DA SEÇÃO DE EXPERIMENTAÇÃO

Em caso de pesquisa com animais contaminados, o pesquisador responsável informa previamente o técnico da seção de experimentação, que vai separar e identificar esse material (tampa, gaiola, bebedouro, maravalha, carcaça do animal) para que seja esterilizado antes do descarte. O material contaminado é embalado dentro da cabine de fluxo laminar pelo próprio pesquisador, e o técnico da experimentação o encaminha para a autoclave de barreira localizada na seção de experimentação. Os valores de temperatura e pressão do processo de esterilização devem ser definidos de acordo com a indicação para eliminar completamente o agente infeccioso em questão[2]. Após o ciclo, o material é retirado pela porta da autoclave na seção de higiene e esterilização.

Terminada a esterilização de todo o material e da carcaça dos animais, o resíduo é encaminhado para descarte de acordo com o Anexo 5.

## HIGIENIZAÇÃO DE MATERIAIS

A higienização, ou limpeza de materiais, consiste no processo de remoção de sujidades e matéria orgânica dos materiais[3] para, posteriormente, serem desinfetados ou esterilizados.

A seção de higiene e esterilização dispõe de uma máquina específica para lavar esses materiais, uma lavadora ultrassônica e quatro tanques de alvenaria (500 L/unidade).

O processo de lavagem de materiais na máquina consiste na higienização a uma temperatura de 80 °C com jatos de água quente e detergente neutro próprio (Figura 5). Normalmente são necessários dois técnicos para realizar essa operação (Anexo 3).

A temperatura da água da lavadora ultrassônica (Figura 3) é de aproximadamente 90 °C, e os bicos são higienizados por meio de vibrações de ultrassom. O tempo aproximado do processo de ultrassom é de 20 minutos.

Podem ocorrer situações em que determinado material precisa ser higienizado e desinfetado nos tanques de alvenaria, seja porque seu tamanho não permite a lavagem convencional na máquina de lavar materiais, seja por motivo de manutenção da máquina.

Nesses casos, utiliza-se outro método de higienização dos materiais, que consiste no preparo de duas soluções nos tanques, sendo uma de detergente e outra de desinfetante com hipoclorito de sódio (5%)[4].

Após a retirada dos resíduos, os materiais são imersos primeiramente na solução detergente por cerca de 20 minutos, para a retirada de resíduos orgânicos. Após o enxágue, os materiais ficam imersos em solução desinfetante por no mínimo 1 hora.

Vale ressaltar que, ao trabalhar com agentes químicos na desinfecção e esterilização, o técnico deve estar atento para a necessidade do uso de EPI, pois esses agentes podem acarretar efeitos indesejáveis sobre a pele, os olhos e o aparelho respiratório.

Figura 5. Máquina de lavar materiais

## ESTERILIZAÇÃO E DESINFECÇÃO

### Autoclaves e processos de desinfecção

**Esterilização** é o processo que destrói ou elimina todos os microrganismos, inclusive microrganismos esporulados e vírus[3]. **Desinfecção** é o processo que destrói microrganismos, patogênicos ou não, porém não elimina todas as formas microbianas (por exemplo, fungos e esporos bacterianos[2,5]).

Os métodos de esterilização e desinfecção são variados. No Biotério utilizam-se as autoclaves para processo de esterilização, e produtos químicos como hipoclorito de sódio, cloreto de benzalcônio e álcool 70%, como agentes desinfetantes. Para garantir a eficácia desses processos[5], todo material a ser desinfetado ou esterilizado precisa passar previamente por higienização para a retirada de resíduos biológicos.

A autoclave produz esterilização mediante calor sob pressão (121 °C) ou vapor fluente (100 °C), sendo este o equipamento mais utilizado na esterilização de materiais e insumos em biotérios[4] (Anexo 4). É um dos métodos mais seguros e confiáveis, pois penetra em materiais porosos, esterilizando-os[6,7].

O Biotério conta com quatro autoclaves de barreira dupla porta (560 L/unidade) (Figura 6), sendo uma para a seção de experimentação e três para a seção de produção. A estrutura de dupla porta não permite a contaminação entre as seções “limpa” e “suja”.

Figura 6. Autoclaves de barreira dupla porta (seção de higiene e esterilização)

A seção de higiene e esterilização é responsável pela organização e logística dos materiais a serem esterilizados para as duas seções, como EPIs, toalhas, caixas, tampas, maravalha, bebedouros, fichas, panos de limpeza, uniformes, entre outros. O Quadro 1 apresenta as características dos ciclos de esterilização por autoclave semanalmente.

Há materiais que não podem ser esterilizados nas autoclaves, por causa do tamanho ou por não resistirem à alta temperatura, como estantes de gaiolas, carrinhos de ração, carrinhos de bebedouros, sacos de ração. Às vezes também não é possível fazer a higienização destes nos tanques de alvenaria. Nesses casos, a desinfecção é realizada na seção de higiene e esterilização por aspersão com álcool 70% ou solução de hipoclorito de sódio (1%), sendo depois fornecidos para as outras seções através das antecâmaras de dupla porta. Além de desinfetar os materiais antes de devolvê-los às seções, é necessário que as antecâmaras sejam constantemente descontaminadas (Anexo 17).

Semanalmente são fornecidos para a seção de produção sacos de ração própria para roedores de laboratório (Anexo 7). Essa ração é descontaminada pelo processo de irradiação gama (12 a 15 kGy) e acondicionada em embalagem adequada, sendo externamente revestida por uma embalagem adicional, para proporcionar maior segurança ao produto. Essa embalagem também é desinfetada antes de ser introduzida na seção de produção.

Quadro 1. Características dos ciclos de esterilização de materiais por autoclave

| **Material** | **Temperatura** | **Tempo (min)** | | | **Tipo de esterilização** | **Média de ciclos/ semana por autoclave** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Pré-vácuo** | **Esterilização** | **Secagem** | | |
| Bebedouros | 100 ºC | ------ | 20 | 10 | Vapor fluente | 10 |
| Caixas, tampas e acessórios de *rack* ventilado | 121 ºC | 5 | 20 | 10 | Vapor sob pressão | 32 |
| Maravalha | 121 ºC | 5 | 20 | 30 | Vapor sob pressão | 8 |
| Instrumental cirúrgico e de necropsia | 100 ºC | X | 20 | 10 | Vapor fluente | 1 |
| EPI | 121 ºC | 5 | 20 | 10 | Vapor sob pressão | 1 |
| Papéis em geral | 121 ºC | 5 | 20 | 30 | Vapor sob pressão | 1 |
| Uniformes e toalhas | 121 ºC | 5 | 20 | 10 | Vapor sob pressão | 5 |

## Controles

Quando da disposição dos materiais na autoclave, estes são organizados de forma que tenham espaços livres para permitir a circulação do vapor[6]. São utilizados indicadores químicos e biológicos para controlar a eficiência dos ciclos[6]. Os indicadores são distribuídos na autoclave de modo que representem o processo de esterilização em mais de um ponto da máquina.

**Indicadores químicos:** são utilizados para detectar a adequada exposição ao calor e ao tempo por meio de mudança na coloração. Para serem eficientes e a informação ser válida, devem ser colocados dentro dos pacotes a serem esterilizados[7]. A fita para autoclave é utilizada como indicador de esterilização em autoclaves. Durante o processo de esterilização, se a máquina atingiu a temperatura adequada, as listras da fita ficam negras, identificando que o ponto de fusão do enxofre foi atingido. Dessa forma, além da confirmação de que a temperatura adequada foi atingida, é possível identificar um pacote esterilizado de um não esterilizado. No entanto, a fita mostra apenas que a autoclave atingiu a temperatura, mas não garante que esta foi mantida durante todo o ciclo.

Outro indicador químico utilizado são as tiras de integradores químicos para vapor, que consideram todos os parâmetros críticos do processo de esterilização (tempo, temperatura e qualidade do vapor) e são colocadas no interior dos pacotes a serem esterilizados.

**Indicador biológio:** cada ampola contém esporos de *Geobacillus stearothermophilus* (microrganismos resistentes a altas temperaturas) e, em separado, o meio indicador de crescimento. Após o ciclo, as ampolas são incubadas a 56 $^{o}$C (+/-2 $^{o}$C) por 24 horas. Se as ampolas mudarem de cor após a incubação, estão indicando que o processo está correto, pois desativou os esporos de microrganismos. A desvantagem desse método é que seu uso é mais difícil e demorado, pois necessita ser incubado, e o material que foi esterilizado só poderá ser utilizado após a confirmação da eficiência do ciclo em 24 horas[7].

## SISTEMA DE AR CONDICIONADO

O Biotério dispõe de um sistema de ar condicionado central denominado sistema HVAC (*Heating, Ventilation and Air Conditioning*). O sistema é composto de três *faincoils*, responsáveis pela ventilação – o primeiro atende a seção de higiene e esterilização, o segundo, a seção de produção e o terceiro, a seção de experimentação –, dois c*hillers,* responsáveis pela refrigeração do ar (Figura 7), e um gerador de energia. Futuramente o sistema será composto de quatro *faincoils* e três *chillers,* para que possa também atender a nova unidade em construção.

*A* insuflação do ar é realizada pelo teto através de dutos ligados ao *faincoil,* com vazão e pressão adequadas para cada seção e taxa de renovação do ar de 20 trocas/h. O sistema tem um pré-filtro de entrada que é substituído mensalmente, um filtro-bolsa com eficiência de filtragem de 85% das partículas, que deve ser substituído semestralmente, e um filtro HEPA com filtragem absoluta do ar, que deve ser substituído com frequência de no máximo dois anos e que retém partículas de 3 mícrons, com eficiência de 99,97% para vírus e bactérias. O sistema que atende a seção de experimentação tem filtragem HEPA também na saída do ar. A exaustão é feita através de dutos nas paredes em dois planos (superior e inferior). A refrigeração das três seções é feita por dois *chillers* automatizados.

O gerador de energia é acionado automaticamente na falta de energia e atende ao sistema de ventilação e iluminação da seção de produção, bem como fornece iluminação de emergência à seção de experimentação. O sistema de ar condicionado retorna ao seu funcionamento normal automaticamente assim que o sistema da rede pública for restabelecido.

Figura 7. *Chillers* que atendem as seções de produção, experimentação e higiene e esterilização

## MANUTENÇÃO DE EQUIPAMENTOS

O Biotério mantém contrato de manutenção para o sistema de ar condicionado e autoclaves, renovado anualmente mediante processo de licitação. As visitas dos técnicos são acompanhadas pelos responsáveis de cada seção e controladas nos cadernos de registro.

## Autoclaves

Na manutenção **preventiva**, é realizada vistoria detalhada por técnicos especializados a cada 15 dias, sendo verificados todos os componentes e variáveis das máquinas, como temperatura, pressão, bombas de água, filtros, drenos e resistência. No final da vistoria, o técnico emite um laudo assegurando que a máquina está em condições adequadas para utilização. Esse tipo de manutenção visa minimizar os riscos de eventuais problemas e aumentar a vida útil do equipamento.

A manutenção **corretiva** é realizada sempre que os equipamentos apresentam algum problema. A empresa responsável pela manutenção é comunicada assim que o problema é constatado, devendo o técnico, o mais rápido possível, avaliar e realizar o conserto, bem como a reposição de peças, se necessário.

## Sistema de ar condicionado

A empresa contratada realiza a manutenção **preventiva**, permanecendo o técnico responsável de plantão no Biotério três vezes por semana, para proceder à limpeza e à conservação das casas de máquinas, à troca de filtros, à limpeza de dutos e grelhas de exaustão e insuflação e à manutenção **corretiva** quando necessário. O técnico também atende a chamados de **emergência** em qualquer dia e horário da semana.

## Máquina de lavar materiais

Não é mantido contrato de manutenção para a máquina de lavar materiais. O técnico responsável é acionado sempre que houver necessidade de manutenção corretiva.

## Manutenção predial

A manutenção das instalações elétrica e hidráulica é realizada pelas equipes de manutenção da FCF-IQ/USP, mediante solicitação no sistema das unidades.

## SALAS DE ESTOQUE

A seção de higiene e esterilização conta com estrutura de armazenagem de materiais em almoxarifado, com sala de estoque de ração e contêiner de estoque de maravalha.

Todo material recebido pela seção é verificado quanto à quantidade, número do lote e data de validade. Posteriormente, é destinado para as respectivas salas.

As salas de estoque devem ser arejadas e secas, para evitar a proliferação de fungos, entre outras contaminações. A maravalha pode estar contaminada e conter microrganismos; por isso, é acondicionada separadamente de outros materiais, em contêiner localizado externamente ao Biotério, uma vez que os processos de descontaminação/esterilização dos insumos são diferenciados[6].

A distribuição dos materiais para as seções de experimentação e de produção leva em conta fatores como estrutura física, composição, tamanho e possível grau de contaminação. O método mais utilizado na introdução de materiais nas seções é a esterilização por vapor fluente ou o vapor sob pressão nas autoclaves.

### Almoxarifado

Entre os materiais estocados no almoxarifado, estão produtos de higiene e desinfecção, EPIs, instrumentos cirúrgicos, seringas e agulhas, caixas de perfurocortantes, sacos para descarte de resíduos e específicos para autoclaves, entre outros materiais para uso e reposição.

Todo material recebido é conferido, registrado e organizado na sala, para facilitar o controle do estoque e a sua distribuição para as outras seções.

### Sala de estoque de ração

A ração utilizada para a manutenção de ratos e camundongos é peletizada e formulada especialmente para roedores de laboratório. No caso dos coelhos utiliza-se ração peletizada especialmente formulada para coelhos de laboratório. Ambas são fornecidas em sacos de 20 kg, e o método de descontaminação é o de irradiação gama (12-15 kGy).

A sala para estoque de ração mantém temperatura e umidade diferenciadas (controladas pelo sistema de ar condicionado) e os sacos estão acondicionados sob paletes, evitando-se o em contato direto com o chão e as paredes.

### Contêiner de estoque de maravalha

O Biotério conta com um contêiner destinado somente ao armazenamento da maravalha utilizada na forração das gaiolas dos animais como cama. A maravalha utilizada é proveniente de madeira pínus de boa qualidade. Antes de ser utilizada, a maravalha (sacos de ráfia de 5 kg) é esterilizada por vapor sob pressão nas autoclaves. Em cada ciclo das autoclaves são esterilizados cinco sacos de maravalha, visando garantir adequada circulação do vapor dentro das autoclaves.

## DESCARTE DE RESÍDUOS

As normas para descarte de resíduos estão regulamentadas pela Resolução nº 283 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama), de 12 de julho de 2001. Consideram-se Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) aqueles provenientes de qualquer unidade que execute atividades de natureza médico-assistencial humana ou animal, os provenientes de centros de pesquisa, desenvolvimento ou experimentação na área de farmacologia e saúde, os medicamentos e imunoterápicos vencidos ou deteriorados, os resíduos oriundos de necrotérios, funerárias e de serviços de medicina legal e aqueles provenientes de barreiras sanitárias[8].

O Biotério produz uma grande quantidade diária de resíduos e carcaças, que podem ou não estar contaminados. Como gerador dos resíduos, é dever do Biotério realizar seu adequado descarte[2] (Anexo 2). Assim, qualquer resíduo que possa conter contaminação deve ser embalado e autoclavado antes do descarte[7].

Os técnicos dessa seção acondicionam os resíduos em sacos brancos identificados com símbolo de risco biológico, que são lacrados e depositados em carrinho de mão e, finalmente, são encaminhados para a lixeira de resíduos hospitalares na área externa. O Biotério da FCF-IQ/USP produz em média 2 mil kilos de resíduos por mês (Figura 8).

É importante salientar que as carcaças de animais submetidos a eutanásia devem ser acondicionadas separadamente, devendo ser previamente armazenadas em *freezer* para depois serem encaminhadas para o setor de descarte de carcaças (em implantação). Todos os sacos brancos, além de apresentarem o símbolo de resíduo biológico, são identificados com os seguintes dados: responsável, peso, data e observações pertinentes (Anexo 5).

Figura 8. A e B) Descarte de resíduos biológicos

## CÂMARA DE $CO_2$ PARA EUTANÁSIA

A utilização de animais em pesquisa e produção em determinado momento requer a realização de eutanásia, que deve sempre visar ao não sofrimento do animal.

O técnico deve ter treinamento e preceitos éticos, e o processo deve ocorrer distante de outros animais[6,9]. O procedimento de eutanásia está descrito no Anexo 6, e é seguido pelo técnico, para garantir a eficiência do processo.

A eutanásia em animais envolve os seguintes critérios: ausência/redução de dor e estresse; produção de inconsciência rápida seguida de morte; irreversibilidade; segurança e mínimo impacto emocional negativo para o técnico; uso de um método adequado à espécie e ao número de animais (Capítulo 6)[10].

Os camundongos e ratos são submetidos a eutanásia em câmara de $CO_2$, uma delas localizada na seção de higiene e a outra na seção de experimentação, sendo este um método químico de eutanásia. Já os coelhos recebem uma overdose de anestésicos injetáveis (xilazina e cetamina), também um método químico de eutanásia, seguido da confirmação do óbito na câmara de $CO_2$.

A câmara de $CO_2$ é apropriada ao tamanho das espécies animais produzidas no Biotério e periodicamente é avaliada a sua calibração. Por medida de segurança, os cilindros com gás estão localizados na parte externa do Biotério.

Antes do acondicionamento das carcaças em sacos brancos com símbolo de risco biológico para descarte, a morte do animal é verificada com a confirmação do cessamento de seus sinais vitais.

## REFERÊNCIAS


1. Brasil. Ministério da Saúde. Anvisa. Critérios para a habilitação de laboratórios segundo os princípios das boas práticas de laboratório (BPL). Brasília; 2001 [citado 7 mar. 2012]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br.
2. Neves SMP, Chaguri LCAG, Fontes RSF, Ong FMP. Biossegurança em biotérios. In: Hirata MH, Hirata RDC, Mancini, Filho JM. Manual de biossegurança. 2a ed. Barueri: Manole; 2012. p.193-211.
3. Mezadri TJ, Tomáz VA, Amaral VLL. Biossegurança em laboratórios de experimentação animal. In: Mezadri TJ, Tomáz VA, Amaral VLL. Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental. Florianópolis: Editora da UFSC; 2004. p. 53-68.
4. De Luca RR, Damy SB. Higiene, desinfecção e esterilização. In: De Lucca RR, Alexandre SR, Marques T, Souza NL, Merusse JLB, Neves SP. Manual para técnicos em bioterismo. 2a ed. São Paulo: Winner Graph; 1996. p. 41-56.
5. USA. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (hicpac). Centers for Disease Control (CDC). Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. Atlanta; 2008 [2012 March 07]. Available from: http://www.cdc.gov/hicpac.
6. Majerowicz J. Boas práticas em biotérios e biossegurança. Rio de Janeiro: Interciência; 2008. 175p.
7. Smith MW. Safety and hygiene. In: Poole T. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 7th ed. British: Blackwell Science; 2006. v. 1, p.141-70
8. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº358 de 2005 [citado 24 set. 2012]. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35805.pdf.
9. Lapchik VBV, Mattaraia VGM. Finalização humanitária. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p.603-15.
10. Brasil. Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Resolução nº 1000. Brasília, 11 de maio de 2012 [citado 7 mar. 2012]. Disponível em: http://www.cfmv.org.br.

Capítulo 6

# Seção de Experimentação

**Flávia de Moura Prates Ong**
**Lívia Duarte Rodrigues**

Introdução
- Descrição da seção

Biossegurança na seção de experimentação
- Padronização da experimentação animal
- Protocolos e procedimentos operacionais padrão
- Equipamentos de Proteção Individual (EPIs)
- Equipamentos de Proteção Coletiva (EPCs)
- Descarte de materiais biológicos
- Riscos ocupacionais

Vias de administração e coleta de sangue
- Imobilização dos animais
- Principais vias de administração de substâncias
- Coleta de sangue
- Coleta de sangue não terminal
- Coleta de sangue terminal com anestesia profunda

Coelhos
- Inoculação
- Coleta de sangue

Anestesia e analgesia de animais de laboratório
- Terminologia básica
- Planejamento e cuidados
- Pré-procedimento
- Durante o procedimento
- Cuidados pós-procedimento
- Medicação pré-anestésica
- Anestesia
- Dor
- Estresse
- Analgesia

Eutanásia
- Mecanismos para causar a morte
- Seleção do método de eutanásia
- Classificação dos métodos de eutanásia
- Métodos químicos
- Métodos físicos
- Eutanásia de fetos e neonatos
- Constatação da cessação dos sinais vitais

Referências

## INTRODUÇÃO

A seção de experimentação é destinada a receber e manter os animais de laboratório em trabalhos experimentais e atende os pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF-IQ/USP).

A equipe da seção é composta de uma técnica de nível médio, uma técnica de nível superior e uma especialista, que atua como chefe da seção.

Atualmente a seção dispõe de uma área física de aproximadamente 200 $m^2$ com sistema de ar condicionado central (Capítulo 5). Esse sistema é capacitado para renovar 100% do ar e controlar as variáveis ambientais: temperatura, umidade relativa e trocas de ar. Essas variáveis são monitoradas continuamente, bem como é realizado o controle de poluentes, odores e contaminantes aerógenos (Quadro 1).

Quadro 1. Condições ambientais da seção de experimentação

| Condições ambientais | Rato | Camundongo |
|---|---|---|
| Temperatura | 22±2 | 22±2 |
| Umidade relativa | 55±10% | 55±10% |
| Trocas de ar | 15-20 trocas/hora | 15-20 trocas/hora |
| Ciclo claro/escuro | 12C/12E | 12C/12E |
| Faixa auditiva (dB) | 0,1 a 65 | 0,75 a 85 |

A partir do momento em que a seção de experimentação foi estabelecida, em 2001, esta vem sendo aprimorada e adaptada aos múltiplos ensaios biológicos realizados pelas duas unidades. Os animais utilizados são provenientes tanto da Seção de Produção como de outros biotérios credenciados, mediante a apresentação do laudo sanitário destes.

Essa seção atende a diversos tipos de ensaios biológicos e linhas de pesquisa, como ensaios de nutrição experimental, toxicologia e parasitologia, e procura atender às especificações de cada experimento. Para isso, disponibiliza salas maiores nos casos em que se torna necessária a instalação de aparelhos e/ou equipamentos grandes a serem utilizados nos experimentos.

O Biotério é utilizado por 60 pesquisadores e são realizados em média cerca de 80 experimentos por ano, na maioria das vezes multidisciplinares de curta, média e longa duração.

Para atender os pesquisadores no que se refere a número de animais, especificações

do experimento e sala experimental, são realizados planejamentos criteriosos entre as seções de produção e experimentação, visando ao sincronismo entre a programação de produção dos animais, que muitas vezes têm peso e idade definidos para cada ensaio, e a disponibilidade da sala experimental com as especificações do experimento (Anexo 2).

A padronização dos procedimentos de rotina, todo o fluxo de entrada e saída das seções, as normas de biossegurança e as normas internas relacionadas ao desenvolvimento correto dos experimentos garantem a qualidade dos trabalhos desenvolvidos e a reprodutibilidade dos resultados entre experimentos.

De acordo com os níveis de biossegurança, a seção de experimentação do Biotério foi classificada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) com o Nível de Biossegurança 2 (NB-2), recebendo o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) em 2000[1].

## Descrição da seção

### Sala de expedição de animais

Sala destinada aos animais que saíram da seção de produção e serão entregues aos pesquisadores. Os animais são retirados da seção de produção para essa sala através do *pass-through* de passagem, para evitar a contaminação cruzada entre as seções de produção e experimentação.

### Salas de experimentação

Um total de 14 salas experimentais (Figura 1) é destinado a experimentos, com a utilização de diversos modelos animais, como heterogênicos, isogênicos, mutantes (imunodeficientes) e geneticamente modificados, de acordo com as espécies de ratos e camundongos.

As salas de experimentação são mantidas com barreiras sanitárias: sistema de pressão negativa com relação ao corredor; filtros seletivos HEPA na entrada e saída do ar; autoclave de barreira; fluxo laminar; e *racks* ventilados.

A iluminação das salas é controlada com temporizadores de iluminação, sendo um para cada sala. Geralmente, são mantidos os ciclos de 12 h claro/12 h escuro. Caso seja necessária a mudança de ciclo, os animais devem passar por um período de adaptação de duas semanas[2] (Capítulo 3).

As salas são identificadas nas portas com os nomes dos pesquisadores, seus ramais e telefones de emergências.

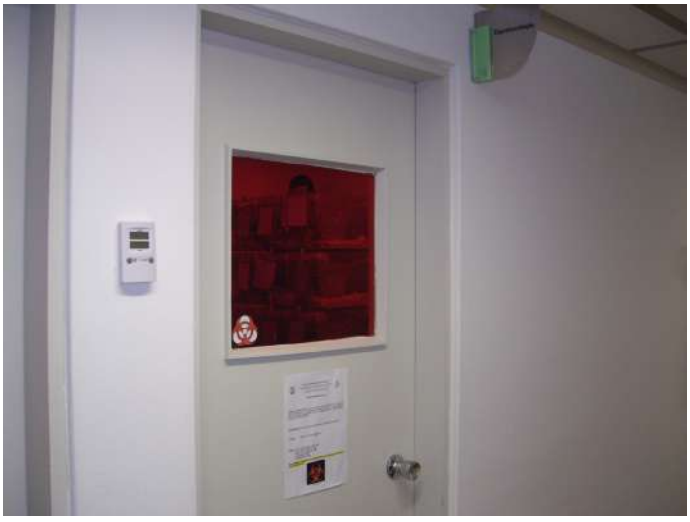


Figura 1. Sala experimental com identificação na porta

Para atender à demanda dos pesquisadores, as salas são compartilhadas. Procura-se selecionar os experimentos que ficarão na mesma sala de acordo com alguns critérios, como, por exemplo, por espécie animal e por experimentos que apresentem necessidades semelhantes. As linhagens geneticamente modificadas permanecem juntas em *racks* ventilados (sistema IVC) ou em gaiolas convencionais (sistema *open cage*) com identificação diferenciada das outras linhagens. Já os trabalhos com imunodeficientes são colocados geralmente na mesma sala.

Os trabalhos que necessitam de aparelhos e gaioleiros específicos, como esteira ergométrica, aparelho de natação, câmara para gases e gaiolas metabólicas, permanecem em salas apropriadas para tais fins.

**Sala de procedimentos**

Essa sala é apropriada para a realização de técnicas e procedimentos experimentais de inoculações, coleta de sangue e cirurgias em geral. Esses procedimentos não podem ser realizados na própria sala dos animais, pois liberam odores e podem ocorrer vocalizações, que acabam estressando os animais, refletindo negativamente nos resultados experimentais.

Os equipamentos disponibilizados são: fluxo laminar; *freezer*; capela; câmara de $CO_2$; aparelho de anestesia inalatória; microscópio; lupa; luz infravermelha; bomba de perfusão;

instrumentais cirúrgicos; e dispositivos artificiais para a contenção de ratos e camundongos. Encontram-se também nessa sala materiais descartáveis para uso em procedimentos, como seringas e agulhas de diversos tamanhos, tubos de ensaio, e um armário específico para materiais de limpeza, sacos de lixo hospitalar, caixas para descarte de perfurocortantes (Figura 2), álcool 70%, detergente e álcool iodado. Essa sala dispõe ainda de adaptadores para a utilização de gás oxigênio e $CO_{2,}$ cujos cilindros estão localizados na parte externa do Biotério (Figura 3). O gás oxigênio é utilizado no aparelho de anestesia inalatória, e o $CO_{2,}$ para a câmara de eutanásia dos animais. Para utilização desses gases, é necessário agendamento prévio, bem como o planejamento criterioso das datas do experimento.

Figura 2. Caixa para o descarte de perfurocortantes

Figura 3. A) Adaptadores para gás $O_{2\ e}$ $CO_{2}$; B) Cilindros localizados na área externa do Biotério

**Sala de esterilização e preparo de materiais**

Essa sala conta com uma autoclave de dupla porta para a esterilização de materiais provenientes da seção de higiene e esterilização para a seção de experimentação. São esterilizados os seguintes materiais nessa sala: gaiolas, grades, maravalha e bebedouros completos com água.

Se houver necessidade de descontaminar gaiolas sujas contaminadas ou animais mortos contaminados, provenientes da seção de experimentação, a descontaminação deve ser realizada seguindo o fluxo da seção de experimentação para a seção de higiene e esterilização. As gaiolas potencialmente contaminadas são embaladas e identificadas com o símbolo de risco biológico, este procedimento é realizado dentro do fluxo laminar (Figura 4). Posteriormente, esse material é colocado na autoclave (Anexo 5).

Encontram-se também nessa sala materiais de limpeza, sacos de lixo hospitalar, sacos autoclaváveis e fichas para identificação de gaiolas.

Figuras 4. A e B) Material contaminado sendo embalado e colocado no fluxo laminar; C) Material embalado sendo colocado na autoclave

**Antecâmara para materiais sujos**

As seções são separadas por antecâmaras, as quais funcionam como barreiras de contenção. Através da antecâmera, os materiais sujos retirados da seção de experimentação são transferidos para a seção de higiene e esterilização.

## BIOSSEGURANÇA NA SEÇÃO DE EXPERIMENTAÇÃO

A biossegurança está relacionada à eficiência das instalações e dos equipamentos de proteção utilizados e às práticas e técnicas criteriosas e padronizadas na produção e durante a experimentação com os animais[3].

Os biotérios de experimentação animal estão classificados em grupos de risco de acordo com os agentes microbiológicos que infectam os animais. Os microrganismos são classificados em ordem crescente conforme critérios de patogenicidade, virulência, modo de transmissão, endemicidade e quanto à eficácia da terapêutica[4].

### Padronização da experimentação animal

Na seção de experimentação foram estabelecidos normas de biossegurança e protocolos internos de procedimentos com o intuito de prevenir e minimizar não só os riscos inerentes ao pesquisador e aos funcionários, como também os riscos à saúde do animal e à qualidade dos trabalhos experimentais[5]. O Quadro 2 apresenta normas gerais de biossegurança.

Na entrada da seção está presente um manual de biossegurança, os POPs da seção e um livro de ocorrências, para que seja anotada qualquer ocorrência relativa a essa área.

A equipe da seção é submetida a atualizações constantes por meio de cursos, palestras, treinamentos[7] e aperfeiçoamentos, e a própria equipe ministra treinamentos técnicos para os usuários do Biotério.

Quadro 2. Normas gerais de biossegurança da seção de experimentação

- ✓ É expressamente proibida a entrada de pessoas não autorizadas nas seções de produção e experimentação
- ✓ Funcionários e usuários devem utilizar os equipamentos de proteção individuais (EPIs) preconizados, como avental, touca, máscara, luvas e pro-pés (sapatilhas)
- ✓ Lavar as mãos antes e após os trabalhos nas salas experimentais
- ✓ É terminantemente proibido comer, beber, fumar, utilizar cosméticos, joias e perfumes com odores fortes no Biotério
- ✓ Na utilização de animais provenientes de outro biotério, estes devem cumprir um período de quarentena sob a supervisão do responsável pela seção. A padronização sanitária desses animais deve seguir as mesmas normas deste Biotério, sendo esta comprovada mediante laudos sanitários
- ✓ Equipamentos e superfícies de trabalho devem ser descontaminados antes e após o uso
- ✓ O descarte de materiais deve ser rigorosamente controlado
- ✓ O lixo resultante das salas experimentais (contaminado) é previamente autoclavado para posterior descarte
- ✓ As carcaças de animais devem ser previamente congeladas antes de serem descartadas e, se estiverem contaminadas devem ser autoclavados antes de serem transferidas para a lixeira hospitalar (Resolução Conama no 358 de 2005)[6]
- ✓ Devem ser seguidas todas as regras de segurança referentes ao seu trabalho, comunicando imediatamente o responsável caso haja qualquer situação de risco
- ✓ Durante a jornada de trabalho, informar imediatamente ao responsável toda e qualquer ocorrência envolvendo mordeduras, arranhões e traumas físicos
- ✓ Todos os procedimentos técnicos devem ser realizados com o intuito de reduzir ao máximo o perigo de formação de aerossóis e particulados no ambiente
- ✓ O responsável pelo Biotério deverá oferecer treinamentos e verificar a capacitação de cada funcionário antes de permitir-lhes o manuseio dos animais de laboratório, além de assegurar-se da capacitação da equipe em relação às medidas de segurança
- ✓ Somente pessoas habilitadas deverão manusear os equipamentos, devendo estes ter suas instruções de uso afixadas em local de fácil visualização
- ✓ Devem-se exigir a leitura e a obediência das normas e dos procedimentos padronizados

São seguidas normas da CTNBio quanto à utilização de animais geneticamente modificados[1,7], sendo de fundamental importância o conhecimento da Resolução Normativa nº 2 e do Decreto nº 5.591, que são as legislações que regulamentam os itens de atribuições da CTNBio, classificação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), níveis de biossegurança e normas para instalações físicas e procedimentos para atividades e projetos que envolvam OGMs[8].

O artigo 7º da Resolução Normativa nº 2, de novembro de 2006, classifica os OGMs em quatro classes de risco (Quadro 3).

A seção de experimentação enquadra-se no nível de Biossegurança Animal 2 (NBA-2), o qual envolve agentes infecciosos bem caracterizados que trazem riscos de doenças a humanos adultos. Os riscos existentes são de contaminação pela ingestão de agentes infecciosos, pela exposição das membranas mucosas ou até mesmo pela pele[11].

Tanto pesquisadores como funcionários seguem os Procedimentos de Boas Práticas Laboratoriais (BPL)[9,10] e os POPs. Estes são escritos e revisados continuamente pela equipe, sendo documentos de qualidade e segurança do Biotério.

Quadro 3. Critérios para a classificação de grupos de riscos por agentes biológicos

| Classificação | Descrição |
|---|---|
| Grupo de risco I | Baixo risco individual e baixo risco para a comunidade. Trata-se de OGM que contém sequências de ADN/ARN de organismo doador e receptor que não causem agravos à saúde humana e animal e efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente |
| Grupo de risco II | Moderado risco individual e baixo risco para a comunidade. Trata-se de OGM que contém sequências de ADN/ARN de organismo doador ou receptor com moderado risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha baixo risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente |
| Grupo de risco III | Alto risco individual e risco moderado para a coletividade. Trata-se de OGM que contém sequências de ADN/ARN de organismo doador ou receptor, com alto risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha baixo ou moderado risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente |
| Grupo de Risco IV | Alto risco individual e alto risco para a coletividade. Trata-se de OGM que contém sequências de ADN/ARN de organismo doador ou receptor com alto risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha elevado risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente |

Fonte: Adaptado de Brasil[1]

## Protocolos e procedimentos operacionais padrão

### Protocolos

Os protocolos de biossegurança do Biotério preveem a garantia da qualidade do animal, bem como a segurança no seu uso. Esses protocolos foram elaborados de acordo com leis nacionais e internacionais. Sendo assim, os aspectos abordados incluem: padronização dos protocolos; treinamento dos funcionários do Biotério e dos usuários (pesquisadores, técnicos, alunos de graduação e pós-graduação); uso de equipamentos de segurança individual e coletiva; validação e manutenção dos equipamentos; adequado descarte de material biológico, sendo os procedimentos criteriosamente organizados em manuais operacionais e continuamente revisados.

Todos os pesquisadores e usuários recebem, ao iniciar seus experimentos na seção de experimentação, as normas internas de biossegurança, que contêm recomendações gerais de técnicas e procedimentos com os animais e um protocolo de experimentação animal a ser preenchido pelo pesquisador, com os devidos termos de responsabilidade.

### Normas internas de biossegurança

As normas internas de biossegurança foram elaboradas pela própria equipe do Biotério, e contêm regras gerais de segurança e BPL, assim como regras específicas deste Biotério.

Essas normas prestam esclarecimentos quanto à solicitação de autorização para realizar trabalhos na seção, explicam o uso correto de EPIs e EPCs e apresentam o local de trabalho quanto às áreas restritas a funcionários e áreas disponíveis ao pesquisador. É de suma importância esclarecer o pesquisador sobre a responsabilidade do experimento que está sendo realizado, a importância do monitoramento dos animais em experimentação, a necessidade de treinamentos prévios de procedimentos e técnicas que serão utilizados nos animais, bem como a correta manipulação destes.

Esse manual descreve como deve ser o comportamento dos usuários em biotérios de experimentação, como manter silêncio nas áreas com animais, como utilizar os materiais que o Biotério fornece, quais são os horários de entrega de animais e outros itens específicos etc. A mesma norma também contém recomendações para os trabalhos com os animais, como preenchimento correto das fichas de identificação das gaiolas, densidade de animais *versus* tamanho da gaiola, dependendo da espécie (Capítulo 4), e a promoção do bem-estar animal com a utilização de itens de enriquecimento ambiental (Capítulo 3).

Os treinamentos para os usuários do Biotério da FCF-IQ/USP abrangem técnicas de biossegurança, treinamento de fluxo operacional (entrada e saída), paramentação adequada, manuseio correto dos animais, técnicas de contenção, imunizações, coleta de sangue e cirurgia (dependendo da técnica que o pesquisador utilizará em sua pesquisa).

## Protocolo experimental

O protocolo experimental (Anexo 22) que o pesquisador deverá preencher ao iniciar os experimentos no Biotério é composto de questões referentes à identificação do pesquisador responsável, do aluno e dos colaboradores, do título do trabalho, dos agentes microbiológicos e/ou substâncias que serão inoculadas e utilizadas nos animais.

Nesse protocolo também há questões sobre os procedimentos e as técnicas a serem utilizados, bem como sobre a necessidade de treinamento para a realização das técnicas, sobre a presença ou a ausência de resíduos e dejetos contaminantes, sobre os cuidados especiais que o funcionário deve ter com os animais, entre outras questões.

No final do protocolo há um termo de responsabilidade para o pesquisador responsável assinar e dar ciência.

## Procedimentos Operacionais Padrão (POPs)

Os POPs permitem a padronização das tarefas, garantindo a seus usuários um serviço livre de variações indesejáveis em sua qualidade final[12]. Dessa forma, os POPs foram elaborados no intuito de fixar condições, padronizar, definir e estabelecer regras e recomendações, que devem ser seguidas por todas as pessoas do Biotério (funcionários, pesquisadores e alunos) que estejam envolvidos em atividades dentro das seções.

Os protocolos padronizam o fluxo de entrada e saída de pessoal, a paramentação correta, o uso adequado dos equipamentos e materiais, o estabelecimento de procedimentos de rotina específicos, como troca de gaiolas de animais, abastecimento de bebedouros e ração, limpeza e higienização das dependências do Biotério, desinfecção e esterilização de materiais e trabalhos específicos para cada experimento.

Foi estabelecido um sistema de numeração para esse documento por seção e por tipo de procedimento, que contém seus anexos afixados em cada sala e equipamento, para anotações diárias de quem realizou o procedimento e a data.

**Rotinas e procedimentos**

São estabelecidas rotinas de procedimentos como troca de gaiolas sujas dos animais, abastecimento de água e ração, bem como higienização e descontaminação das salas experimentais (Anexo 18). Nesse protocolo estão descritos todos os procedimentos de descarte de materiais contaminados, perfurocortantes e de carcaças de animais.

Cada sala experimental mantém fichas de controle, onde são anotadas as trocas de gaiolas, ocorrências e procedimentos realizados, com a devida identificação de quem realizou os procedimentos e em que data.

## Equipamentos de Proteção Individual (EPIs)

Tanto os funcionários como os usuários devem utilizar a paramentação correta para acesso às seções com animais. O uso desses equipamentos minimiza a exposição aos riscos ocupacionais, evita acidentes em laboratórios e a contaminação dos animais por microrganismos. Os EPIs são regulamentados pela Portaria nºs 3.214 NR-6 do Ministério do Trabalho[13] e devem estar disponíveis para as tarefas específicas que exijam o seu uso (Figura 5).

A paramentação correta consiste em:

1. Realizar a assepsia das mãos (higienização das mãos, com água e sabão, e álcool 70% no final do procedimento);
2. Colocar os pro-pés (sapatilhas) que envolvem os sapatos;
3. Colocar a touca, que deve cobrir toda a cabeça e os cabelos;
4. colocar a máscara de forma que cubra a boca e o nariz;
5. Vestir o avental do próprio Biotério, o qual deve ser devidamente fechado, inclusive na parte do pescoço;
6. Colocar as luvas (recomendam-se duas luvas para cada mão)(*);
7. Passar álcool 70% sobre as luvas.

Na saída do Biotério, deve-se realizar novamente a assepsia das mãos, fazendo a lavagem com sabão e a descontaminação com álcool 70%, após a retirada do segundo par de luvas.

(*) Padronizou-se a colocação de duas luvas em cada mão, para que, ao sair do Biotério experimental, na própria sala, o pesquisador, usuários e funcionários façam a retirada da luva externa e passe álcool 70% na luva de baixo, podendo assim abrir as portas.

Figura 5. Funcionários devidamente paramentados antes de entrar na seção de experimentação

## Equipamentos de Proteção Coletiva (EPCs)

Os EPCs só podem ser manuseados por pessoas habilitadas, devendo ter suas instruções de uso afixadas em local de fácil visualização.

Equipamentos como ar-condicionado central, gerador de energia elétrica, autoclaves, máquinas de lavar gaiolas, estufas, fluxo laminar, entre outros, devem ser rigorosamente inspecionados e registrados nas devidas fichas de controle de manutenção de equipamentos[14].

Os usuários devem ter conhecimento da localização e dos procedimentos de utilização de extintores de incêndio, bem como ficar atentos à sua validade (Figura 6).

Figura 6. Extintor de incêndio

**Exemplos de EPCs:** capelas de fluxo laminar; capela química; equipamentos de socorro imediato (chuveiro lava-olhos, pia, sabão, escova etc.); caixas com luvas; equipamentos portáteis de oxigênio; extintores de incêndio; condicionadores de ar; caixas para perfurocortantes; circulador/ventilador; autoclave; recipientes para rejeitos; recipientes especiais para transporte de material contaminado e/ou animais; pipetas mecânicas; exaustores; e dispositivos de segurança em máquinas e equipamentos.

## Descarte de materiais biológicos

Todo resíduo (lixo) proveniente da seção de experimentação deve ser acondicionado em sacos plásticos brancos hospitalares, identificados com o símbolo de risco biológico e colocados na antecâmara para materiais sujos, onde serão recolhidos e encaminhados para o descarte pela seção de higiene e esterilização (Capítulo 5) de acordo com o Anexo 5.

As carcaças de animais devem ser previamente congeladas antes de serem descartadas[14]. Para o descarte de materiais perfurocortantes[12], como seringas e agulhas, deve-se descartar o conjunto todo (não recapear as agulhas) em caixas próprias para materiais perfurocortantes (Figura 2), encontradas nas salas experimentais e de uso comum da seção.

## Riscos ocupacionais

Os biotérios apresentam problemas únicos, que podem atingir funcionários e pesquisadores, como riscos ergonômicos, químicos, biológicos, mecânicos, além de mordeduras e arranhões de animais e reações alérgicas[12].

Com relação ao ambiente de trabalho, existem alguns odores animais que podem ser agressivos aos seres humanos. Esses odores são produzidos pela decomposição bacteriana dos excrementos. Contudo não se devem utilizar produtos que mascarem esses odores, pois podem ser nocivos para os animais e atrapalhar o comportamento normal da espécie[14]. Nessa seção, tais odores são controlados por procedimentos rotineiros de limpeza, com produtos de baixa toxicidade aos animais, e pela manutenção da ventilação adequada.

Para controlar acidentes, a FCF e IQ contam com uma Comissão Interna de Prevenção de Acidentes (CIPA), que tem função educativa e de conscientização quanto aos riscos de acidentes no trabalho.

O pesquisador ou o responsável pela experimentação animal devem assegurar que todas as pessoas que tenham contato com animais de laboratório e/ou com materiais de descarte sejam avisadas do risco potencial. É de responsabilidade do pesquisador comunicar à direção do Biotério quanto à necessidade de alguma medida profilática para a realização de seu experimento, como, por exemplo, imunizações com vacinas apropriadas[5].

## Zoonoses

Zoonoses são infecções transmitidas dos animais para os homens e vice-versa,

podendo afetar seriamente o operador e os projetos de pesquisa[11].

As pessoas que estão potencialmente expostas a esses riscos são aquelas que sofrem de alguma falha em seu sistema imune e/ou aquelas que apresentam doenças não aparentes[12].

Os trabalhos que envolvem exposição aos microrganismos requerem a imunização de toda a equipe técnica, desde que haja vacina disponível.

### Alergias

A alergia é uma resposta de hipersensibilidade que se desenvolve como resultado de repetitivas exposições a substâncias denominadas alérgenos. A alergia a animais de laboratório (ALA)[12,15] é uma desordem relativamente comum que se desenvolve em alguns indivíduos expostos a proteínas desprendidas dos animais, presentes na urina, no pelo, na saliva e no soro.

Os sintomas variam de leves a graves, podendo ocasionar rinite, conjuntivite, rachaduras na pele semelhantes às decorrentes de urticária, asma etc.

Como medidas para reduzir o grau de exposição aos alérgenos, devem ser providenciados ventilação adequada, métodos de limpeza que não produzam aerossóis, como varredura úmida, e utilização de EPIs (máscaras, protetores faciais, luvas, entre outros). Atualmente, existem os sistemas de *racks* ventilados[16], que também diminuem a exposição do trabalhador às substâncias alergênicas.

## VIAS DE ADMINISTRAÇÃO E COLETA DE SANGUE

Em geral, os roedores de laboratório não são agressivos e podem ser manuseados sem grandes problemas. No entanto, devem ser previstos protocolos de treinamento para o manuseio e contenção dos animais que abranjam, também, as vias de administração e coleta de sangue.

Os treinamentos prévios são indispensáveis para o bom desempenho dos trabalhos experimentais, pois não só facilitam o manuseio dos animais como também contribuem para a prevenção de lesões e um nível adequado de segurança tanto para o animal como para o operador. As comissões de ética em uso animal da FCF-IQ/USP solicitam, já na avaliação do projeto de pesquisa, informações quanto à experiência do aluno e os procedimentos que serão realizados nos animais (Capítulo 2).

Quanto ao manuseio dos animais, os alunos são orientados para que estes sejam abordados, manipulados e contidos com cuidado e profundo respeito, devendo ser tomadas todas as precauções possíveis com o intuito de garantir o mínimo de estresse durante a manipulação[17,18].

A administração de drogas, anticorpos, células ou outros agentes representa uma etapa fundamental no processo de avaliação da atividade biológica em animais. Tais procedimentos são amplamente utilizados na seção de experimentação. Na escolha da melhor via de administração, deve-se ter conhecimento das características químicas e físicas da substância, pois a via de administração depende da propriedade da substância e do objetivo de estudo. Atenção especial também deve ser dada à concentração, ao pH, à viscosidade, à esterilidade, à pirogenicidade e à toxicidade das substâncias, bem como à existência de elementos potencialmente perigosos[19, 20, 21].

O conhecimento de métodos e técnicas disponíveis para a administração de substâncias, bem como das características de seu metabolismo de distribuição tecidual, possibilita ao pesquisador selecionar a rota mais adequada para a finalidade de seu estudo. Entre as várias possibilidades para a administração de substâncias aos roedores, as rotas mais comuns são: via oral (VO) e gavagem, injeções subcutânea (SC), intramuscular (IM), endovenosa (EV) e intraperitoneal (IP). A rota deve ser selecionada e treinada antes do início de qualquer experimento[19,20,21].

A partir do momento em que os animais solicitados pelo pesquisador são entregues na sala experimental em uso, é recomendado um período de adaptação de uma a duas semanas. A adaptação proporciona aos animais a oportunidade de se recuperarem do transporte e de se aclimatizarem em seu novo ambiente[2].

Nesse período, o operador deve manuseá-los para que se adaptem ao seu cheiro e à rotina do manuseio e para introduzir o treinamento das técnicas e procedimentos que serão realizados. Um exemplo de treinamento de técnicas é o uso da guilhotina. Esse tipo de equipamento é introduzido nas gaiolas dias antes da eutanásia, para que os animais se acostumem com o objeto novo e, no momento da eutanásia, não fiquem muito estressados[22,23].

O conhecimento das técnicas que serão realizadas nos animais e os treinamentos prévios garantem a maior qualidade do resultado dos procedimentos.

## Imobilização dos animais

### Transferência de gaiolas

Ao lidar com os animais, devem-se evitar agitação e movimentos bruscos. Deve-se

esperar alguns instantes para que os animais investiguem a mão do operador e o cheiro da luva.

Para a transferência de uma gaiola para outra, bem como para a pesagem dos animais, os ratos devem ser manuseados de forma gentil e firme, suspendendo o animal com a mão atrás das patas dianteiras e da cabeça, pelo meio do corpo. Não é recomendável o manuseio do animal pela cauda, tendo em vista que o animal pode se tornar mais agressivo e intolerante a manipulações futuras[23,24] (Figura 7).

Já os camundongos são manuseados pela base da cauda. Se o trajeto for longo, deve-se apoiar o animal (Figura 8).

Em caso de transferência de mãe com sua ninhada, a mãe é removida em primeiro lugar, a fim de não provocar reações defensivas dela quando o ninho é retirado da gaiola. O ninho e todo o seu conteúdo devem ser levantados e levados para a nova gaiola, que deverá ser gentilmente recolocada na estante[23,25].

Figura 7. Manuseio de rato para troca de gaiola

Figura 8. Manuseio de camundongos para a troca de gaiola (linhagem BALB/c)

## Contenção para inoculações

A contenção caracteriza-se pela imobilização de um animal por inteiro ou de parte dele, em um ambiente confortável e seguro, utilizando as mãos ou um dispositivo artificial. A contenção é realizada no animal consciente, submetido a manipulação que não requer sedação ou anestesia, porém exige um posicionamento preciso dos animais. Uma boa contenção evita movimentos inesperados durante a manipulação[19,20,25].

## Contenção manual para ratos

A contenção manual consiste em apoiar a mão delicadamente sobre o dorso do animal e envolvê-la abaixo dos membros anteriores. Se necessário, segurar os membros posteriores[19,26]. Essa técnica pode ser realizada tanto dentro da gaiola como em cima da grade (Figura 9).

Outro procedimento também consiste em apoiar a mão sobre o dorso do animal puxando-lhe toda a pele (Figura 10).

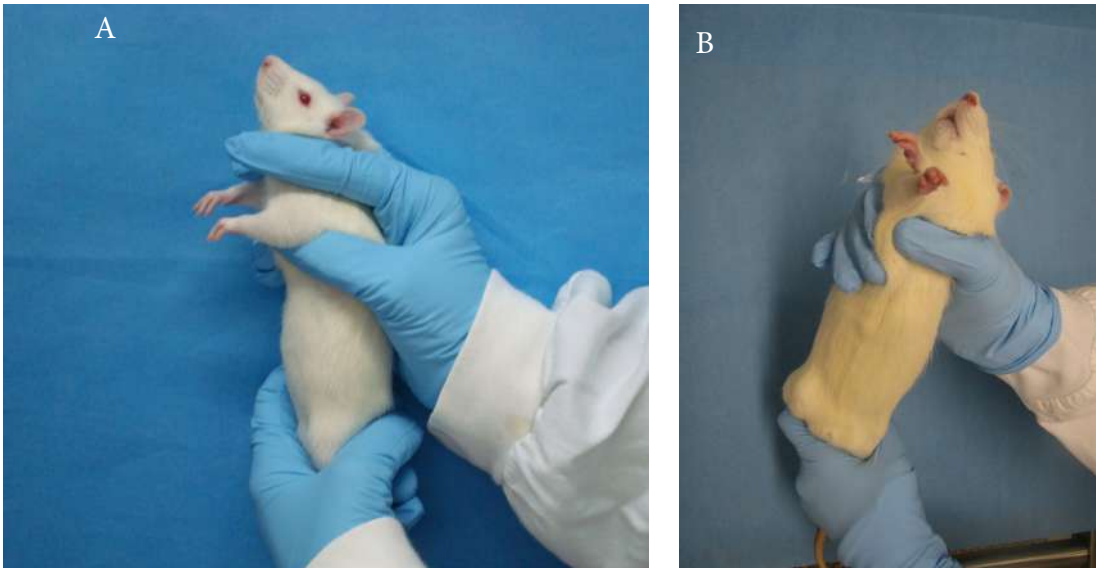



Figura 9. A) Contenção de rato segurando-lhe o pescoço com os dedos indicador e médio; B) Contenção de rato envolvendo-lhe o dorso abaixo dos membros anteriores

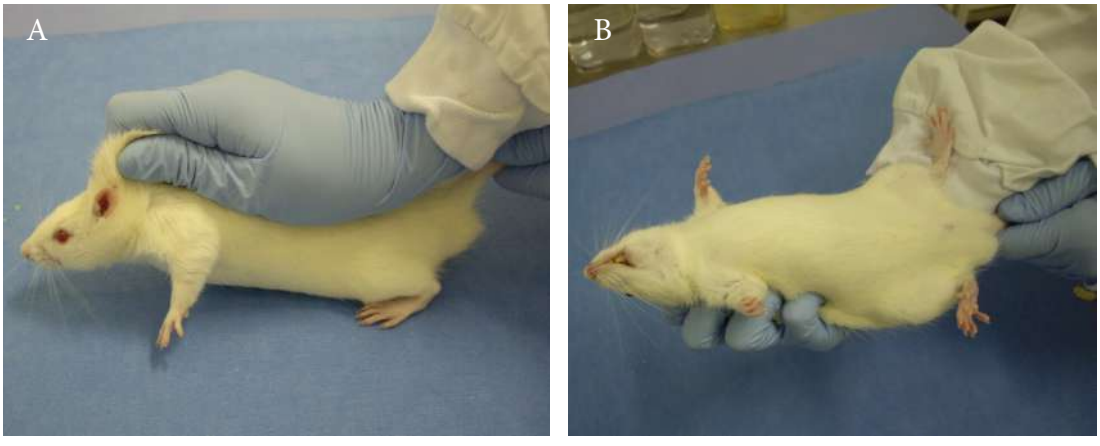



Figura 10. Contenção manual para ratos puxando-lhe toda a pele do dorso

## Contenção manual para camundongos

Para realizar a contenção manual de camundongos, deve-se apoiar o animal em uma grade e pegar-lhe a cauda pela base, puxando-a delicadamente para trás. Com isso, o animal tende a avançar e segurar a grade com suas patas dianteiras. Então, o operador deve aproximar o dedo indicador e polegar da parte traseira. A dobra da pele do pescoço, muito perto das orelhas, é apreendida com o polegar e o indicador, enquanto a pele solta restante

é apreendida com os outros dedos[19, 26]. É importante prender bem a pele solta do pescoço, para que o animal não consiga virar e morder o operador. Ao girar a mão, o camundongo fica com sua face ventral virada para cima, e sua cauda é então presa entre o dedo anular e a ponta do dedo mínimo.

A contenção não deve ser muito apertada, pois pode dificultar a respiração do animal, os olhos ficam saltados e a frequência cardíaca aumenta. Também não pode ser muito solta, pois podem ocorrer acidentes: por exemplo, o animal pode girar e morder ou arranhar o operador. Deve-se atentar também para a aplicação incorreta de injeções. Portanto, a perfeita contenção reduz o estresse do animal (Figura 11).

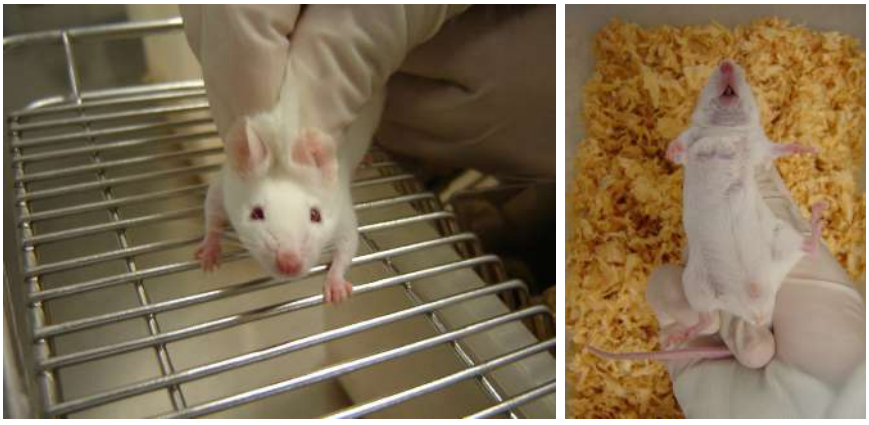


Figura 11. Contenção de camundongo puxando-lhe a pele do dorso

## Dispositivos artificiais

Dispositivos artificiais estão sendo continuamente desenvolvidos por empresas especializadas. Os contensores possibilitam que o operador fique com as mãos livres para a execução dos procedimentos[19,23].

Alguns exemplos de contensores artificiais são demonstrados na Figura 12.

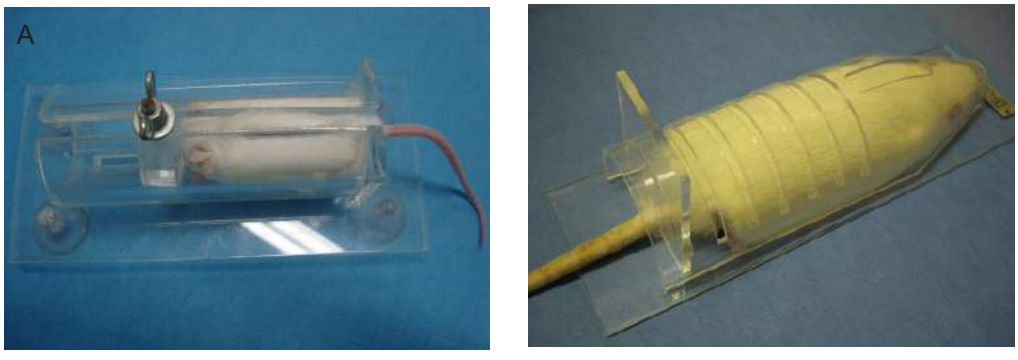



Figura 12. A) Contensor artificial para camundongo; B) Contensor artificial para rato

## Principais vias de administração de substâncias

O Quadro 4 apresenta o volume de administração de substâncias para ratos e camundongos.

Quadro 4. Volume para administração de substâncias e dimensão de agulhas de acordo com as diferentes vias

| Espécie/via | Subcutânea | Intramuscular | Intraperitoneal | Endovenosa |
|---|---|---|---|---|
| **Rato** | | | | |
| Volume (mL) | 5-10 | 0,3 | 5-10 | 0,5 |
| Agulha (mm) | 13 x 25 ou 25 x 5 | 20 x 5,5 ou 25 x 6 | 25 x 6 ou 20 x 5,5 | 25 x 5 |
| **Camundongo** | | | | |
| Volume (mL) | 2-3 | 0,03 | 2-3 | 0,2 |
| Agulha (mm) | 13 x 4,5 ou 25 x 5 | 13 x 4,5 ou 25 x 5 | 13 x 4,5 ou 25 x 5 | 13 x 4,5 ou 25 x 5 |

Fonte: Adaptado de *Canadian Council on Animal Care in Science*[22] e Flecknell[29].

### Via oral

O método mais simples para a administração oral é dar a substância misturada à comida ou à água potável. A quantidade de alimento e água que o animal ingere deve ser conhecida, para calcular a substância a ser misturada.

### Gavagem

A agulha ponta-bola é usada para evitar danos ao esôfago. O animal é manualmente contido, sendo a imobilização da cabeça essencial nesse procedimento. A agulha é introduzida lentamente na cavidade oral, através da boca e da faringe para o esôfago[17,27]. Nenhuma resistência deve ser sentida, e deve-se assegurar que o tubo não penetre na traqueia (Figura 13). A substância tem de ser administrada lentamente.

Os roedores comem e bebem muitas vezes ao dia. Por esse motivo, dificilmente estão com o estômago vazio. Como a distensão máxima do estômago é no final do período escuro e a quantidade mínima, no final do período claro, pequenos volumes devem ser administrados

no início do período claro. O volume indicado é de 1 mL de solução para cada 100 g de peso corporal. Se a solução for aquosa, esse volume pode subir para 2 mL para cada 100 g de animal[17].

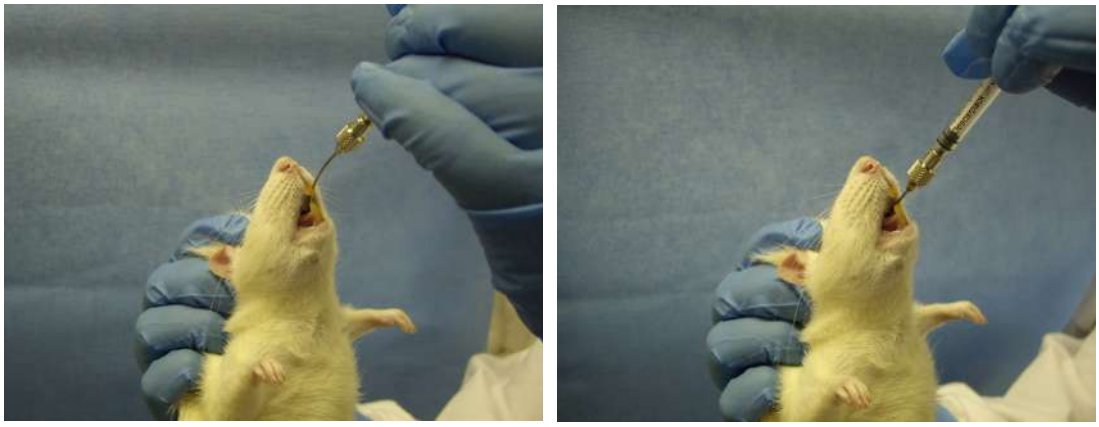


Figura 13. Gavagem em rato

## Administração subcutânea

A administração subcutânea é fácil e raramente dolorosa. A velocidade de absorção é inferior em comparação às vias intraperitoneais e intramusculares. Essa administração é geralmente realizada na pele solta das áreas dorsolaterais do pescoço, do ombro e dos flancos.

Nesse procedimento, o animal é contido manualmente e, então, apoiado sobre uma toalha ou superfície limpa, a agulha é inserida sob a pele solta, apreendida com o polegar e o indicado, e, em seguida, injeta-se a substância[19,26,28] (Figura 14).

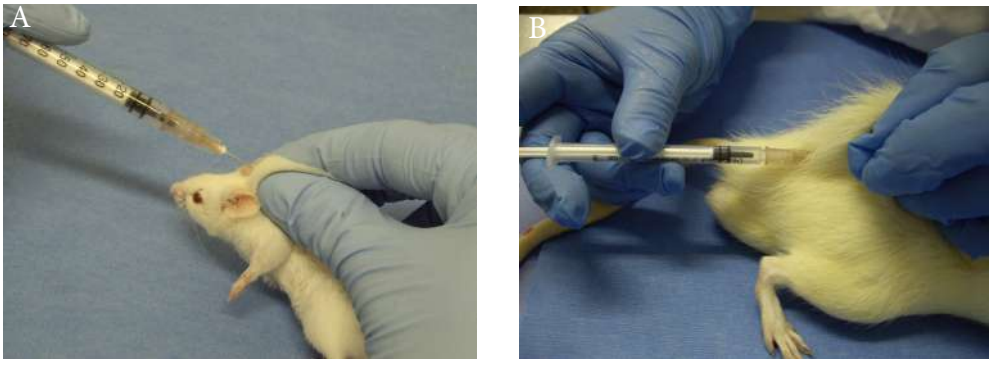



Figura 14. A) Inoculação subcutânea na região da pele do pescoço; B) Inoculação subcutânea na região do flanco

## Administração intramuscular

Essa via é usada para pequenos volumes, pois o músculo dos ratos e camundongos é de pequeno porte. A substância é injetada no músculo da porção posterior das patas traseiras, devendo ser direcionada para longe do fêmur e nervo ciático. Quando o animal está anestesiado ou manualmente contido, a ponta da agulha é inserida através da pele e no músculo. Aspirar brevemente com a seringa antes de injetar a substância, para certificar-se de que não retorne sangue, caso a agulha penetre um vaso[19,26,28](Figura 15).

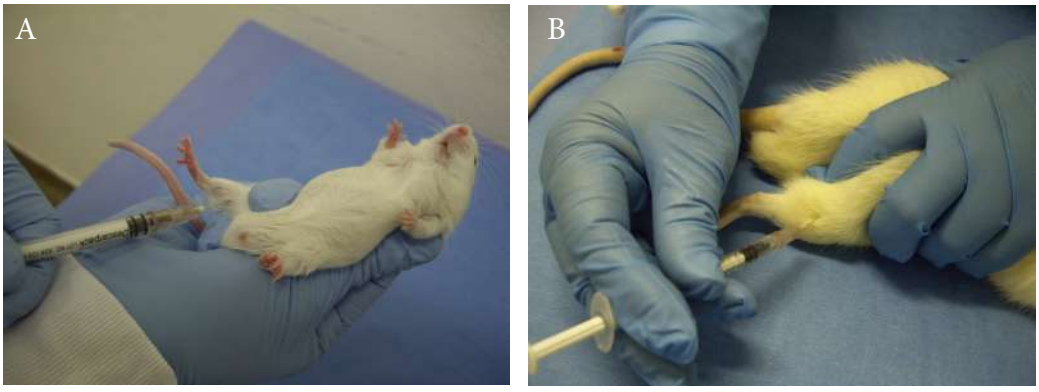



Figura 15. Inoculação intramuscular

## Administração endovenosa

Administra-se a substância diretamente na corrente sanguínea do animal. A vantagem dessa via sobre as outras e que podem ser administradas soluções com pH alto ou baixo, e são absorvidas mais rapidamente. A administração geralmente é lenta, evitando-se que a solução extravaze para fora da veia. Essa técnica, apesar de parecer simples, exige conhecimento e habilidade do operador.

O procedimento consiste em preencher primeiramente a seringa já com agulha, podendo-se utilizar também um cateter com a solução a ser injetada, evitando-se a formação de bolhas de ar. A administração geralmente é realizada na veia lateral da cauda do animal, e não na veia dorsal da cauda, uma vez que esta não se configura como uma reta.

As veias laterais são facilmente visualizadas, porém são de pequeno diâmetro. Se não for utilizada anestesia, deve-se utilizar um dispositivo artificial de contenção. A cauda é então aquecida com lâmpada ou toalha quente ou até mesmo imersa em água morna (40 °C). Para dilatar os vasos, limpar a cauda com álcool 70% em uma gaze ou cotonete.

Inserir a agulha paralela à veia da cauda, penetrando de 2 mm a 4 mm para o lúmen, mantendo o bisel da agulha com a face para cima. A solução é então injetada lentamente, e nenhuma resistência deve ser sentida. No final da administração, manter o local pressionado por uma gaze ou cotonete, para evitar o refluxo da solução ou sangue[19,26,28] (Figura 16).

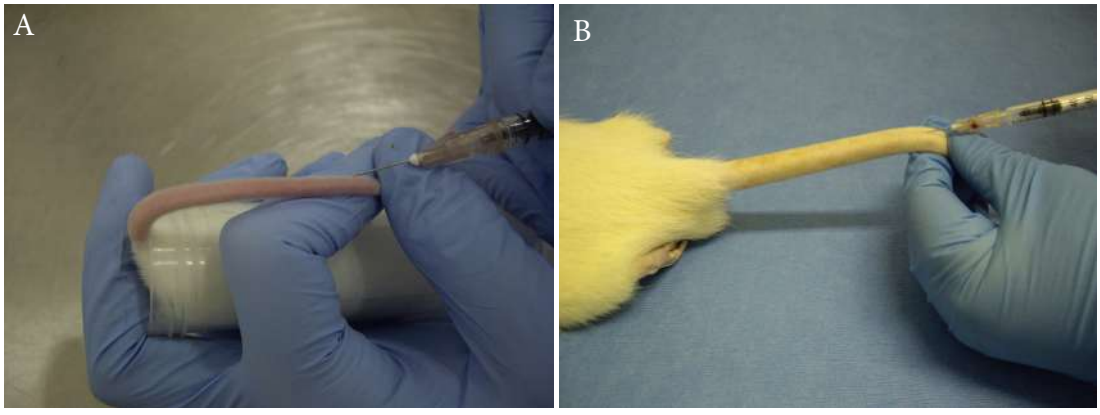
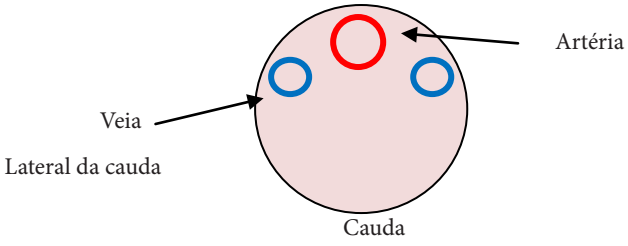



Figura 16. A) Inoculação endovenosa na cauda do camundongo; B) Inoculação endovenosa na cauda do rato




## Administração intraperitoneal

O animal deve ser contido pelo dorso, como descrito no item “Contenção manual”. Com a contenção, o animal é posicionado com a sua face ventral voltada para cima. Normalmente, a injeção é aplicada no quadrante posterior do abdome, do lado direito do animal e do esquerdo do operador. A substância é injetada na cavidade peritoneal entre os órgãos abdomnais.

Algumas limitações da via intraperitoneal são a sensibilidade do tecido a substâncias irritantes e menos tolerância a soluções de pH não fisiológicos, contudo é uma via que suporta grandes volumes[19,26,28] (Figura 17).

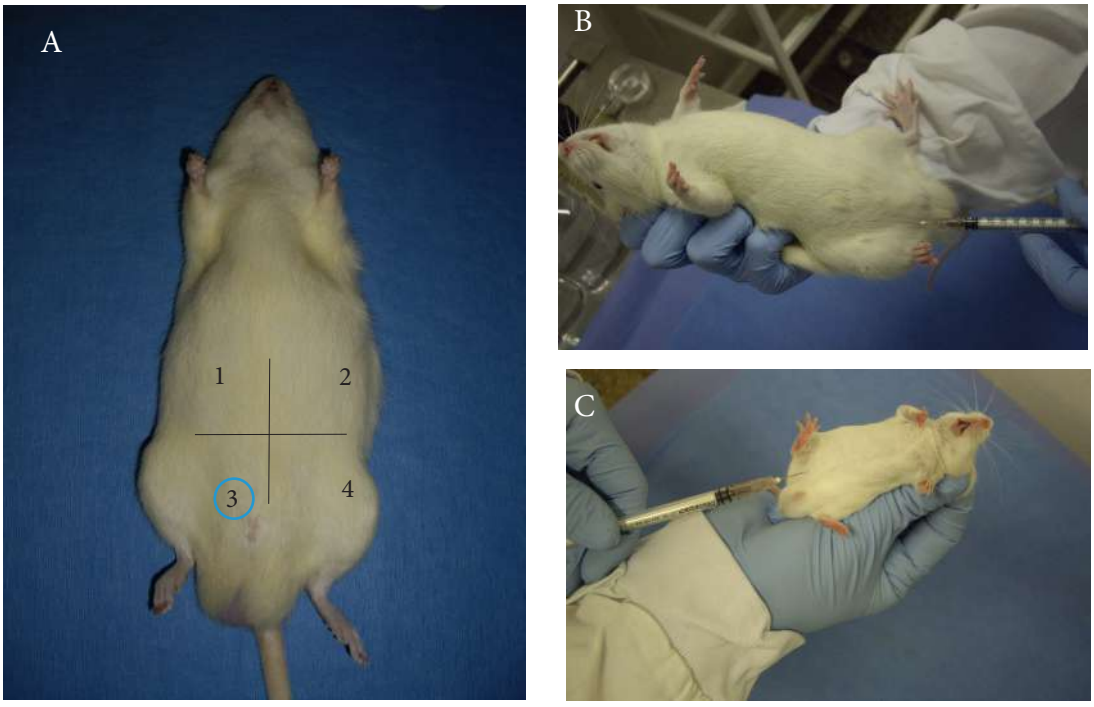



Figura 17. A) O quadrante inferior esquerdo (3) é a melhor área para aplicar a injeção intraperitoneal; B) Injeção intraperitoneal em rato; C) Injeção intraperitoneal em camundongo

## Administração intradérmica

Geralmente, essa via não é recomendada e deve ser restrita aos casos de absoluta necessidade.

O animal deve ser anestesiado e, posteriormente, realiza-se a tricotomia do local da administração, que pode ser uma pequena área sobre as costas, o abdome ventral ou as patas traseiras; estas devem ser limpas com álcool 70% em gaze ou haste de algodão[29].

A pele do animal é esticada com o dedo polegar ou indicador, e a agulha inserida logo abaixo da camada superficial da epiderme. A aplicação da injeção pode ser constatada pela formação de uma bolha na pele do animal. O volume a ser administrado é de 0,05 mL por local de administração[19,26,28] (Figura 18).

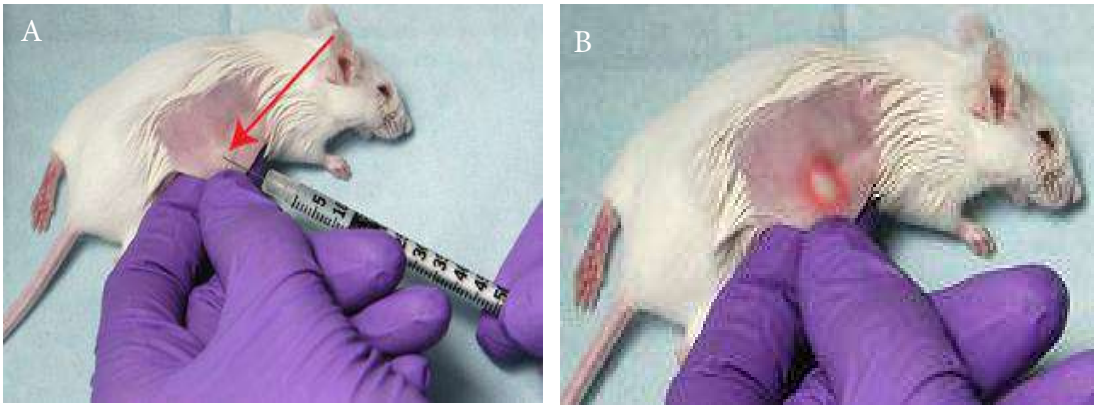



Figura 18. Injeção intradérmica no camundongo (Fonte: Disponível em: http://www.theodora.com/rodent_laboratory/injections.html)

## Administração intracerebral

O animal é anestesiado e, em seguida, contido manualmente sobre uma superfície sólida. O local da administração é a metade da distância entre o olho e a orelha do animal. A agulha perfura diretamente o crânio do animal. O volume a ser administrado é de até 0,03 mL por local de administração[19,26,28].

## Administração intranasal

O animal deve ser levemente anestesiado e manualmente contido, permanecendo com a cabeça elevada. A ponta da pipeta é colocada nas narinas externas e, então, a solução é passada lentamente para as narinas. O volume a ser administrado é de 0,02 mL por local de administração[19,26,28] (Figura 19).

Figura 19. Administração intranasal em camundongo

## Coleta de sangue

Existem variadas técnicas de coleta de sangue, tanto para ratos como para camundongos. Porém para a melhor escolha da técnica, deve-se ter conhecimento de alguns parâmetros relacionados aos animais, como espécie, tamanho do animal, tipo de amostra necessária (soro, plasma, células inteiras), qualidade da amostra necessária (esterilidade, contaminação de fluídos, tecidos), quantidade de sangue necessária, frequência de amostragem, estado de saúde do animal, formação e experiência do operador e efeito da contenção ou anestesia sobre o parâmetro arterial medido[27].

A frequência e o volume aceitáveis de coleta de sangue dependem do volume total de sangue circulante dos animais e da quantidade de glóbulos vermelhos (RBC). Como representativo do volume de sangue total, calcula-se 10% do peso dos ratos e 6% a 8% do peso dos camundongos,.

Do volume de sangue circulante, cerca de 10% do volume total pode ser removido com segurança a cada duas a quatro semanas; 7,5% desse volume pode ser removido a cada sete dias; e 1% a cada 24 horas[17,20,25], como descrito na Tabela 1.

Para a coleta de volumes maiores que o recomendado, deve-se apresentar uma justificativa e fazer a reposição de líquidos e substitutos celulares. É importante salientar que o volume de sangue é recuperado em 24 horas, mas os eritrócitos retornam aos níveis normais somente em duas semanas.

Tabela 1. Volume de sangue aproximado e intervalos entre coletas

| Peso do animal (g) | Volume de sangue circulante (mL) | 1% (mL) A cada 24 h | 10% (mL) A cada duas semanas |
|---|---|---|---|
| 20 | 1,10-1,40 | 0,011-0,014 | 0,11-0,14 |
| 25 | 1,37-1,75 | 0,014-0,018 | 0,14-0,18 |
| 30 | 1,65-2,10 | 0,017-0,021 | 0,17-0,21 |
| 35 | 1,93-2,45 | 0,019-0,025 | 0,19-0,25 |
| 40 | 2,20-2,80 | 0,022-0,028 | 0,22-0,28 |
| 125 | 6,88-8,75 | 0,069-0,088 | 0,69-0,88 |
| 150 | 8,25-10,50 | 0,082-0,105 | 0,82-1,0 |
| 200 | 11,00-14,00 | 0,11-0,14 | 1,1-1,4 |
| 250 | 13,75-17,50 | 0,14-0,18 | 1,4-1,8 |
| 300 | 16,50-21,00 | 0,17-0,21 | 1,7-2,1 |
| 350 | 19,25-24,50 | 0,19-0,25 | 1,9-2,5 |

Fonte: Adaptado de National Research Council[25].

## Coleta de sangue não terminal

### Retro-orbital

Esse procedimento não é recomendável, uma vez que se pode cegar o animal caso o operador não esteja bem treinado. Por isso, sua utilização deve ser muito bem justificada.

O animal deve estar anestesiado e manualmente contido. Apoia-se o animal sobre uma superfície lisa e penetra-se com uma pipeta Pasteur ou tubo capilar em um ângulo de 45° no canto do olho, sob o globo ocular. Gira-se levemente o capilar durante a entrada e espera-se o sangue escorrer por um tubo.

O procedimento é rápido, o volume de sangue coletado é de médio a grande e obtém-se boa qualidade da amostra. Deve-se esperar o mínimo de dez dias para que o tecido seja reparado antes de repetir a coleta. Pode-se utilizar, além da anestesia geral, um anestésico oftálmico de propacaína ou tetracaína[17,19,27] (Figura 20).

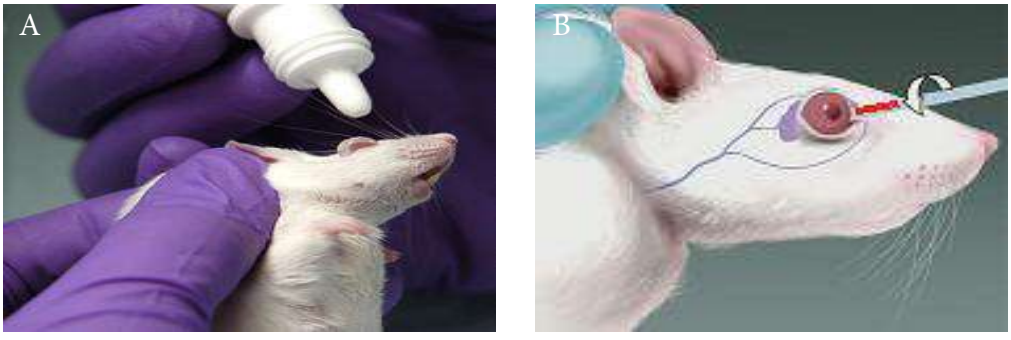



Figura 20. A) Anestésico oftálmico; B) Coleta de sangue via retro-orbitral (Fonte: Disponível em: http://www.theodora.com/rodent_laboratory/blood_collection.html)

### Mandibular (veia facial)

Essa via é limitada a camundongos adultos, e o volume de sangue obtido é de médio a grande. A amostra apresenta-se como uma mistura de sangue venoso e arterial.

Para essa técnica, não é recomendado o uso de anestesia, para que não haja o relaxamento facial e a consequente mudança de posição do plexo sanguíneo.

Dependendo da necessidade do experimento, podem-se utilizar agulhas de vários calibres para controlar a quantidade de sangue coletado, até mesmo uma lanceta nº 11. Nesse procedimento, espeta-se a agulha ou a lanceta logo atrás e abaixo da marca do masseter, localizado na região da bochecha do animal.

Para finalizar o procedimento, utiliza-se uma gaze estéril para estancar o sangramento[19,20] (Figura 21).

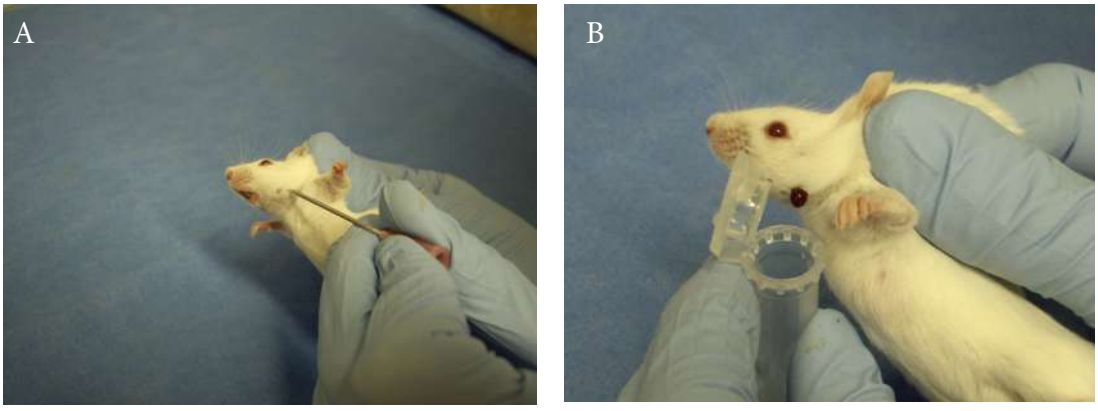



Figura 21. Coleta de sangue na veia facial do camundongo

## Veia safena

Pode ser utilizado tanto para ratos como para camundongos, perfurando-se a veia safena com uma agulha. O volume de sangue obtido é de pequeno a médio, e a qualidade da amostra é variável.

Deve haver uma contenção efetiva do animal, não necessitando da utilização de anestésicos.

A veia safena é encontrada na superfície externa da coxa. Para melhor visualização, devem-se remover os pelos da região da coxa do animal.

O camundongo pode ser contido em um tubo de 50 mL, cortando-se a ponta do tubo, para que o animal respire. O camundongo é inserido nesse tubo com a cabeça para dentro, o que favorece  o manuseio de suas patas traseiras.

Para visualizar a veia, prende-se a parte logo acima da coxa do animal como se fosse um garrote ; em seguida, pode-se aplicar um lubrificante para facilitar a coleta. Introduzir a agulha e coletar as gotas de sangue que surgem[19,30] (Figura 22).

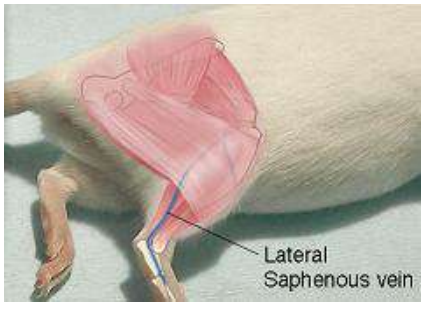



Figura 22. Localização da veia safena lateral (Fonte: Disponível em: http://www.theodora.com/rodent_laboratory/blood_collection.html)

## Veia da cauda

Essa coleta pode ser realizada tanto em ratos como em camundongos. A qualidade da amostra é variável, podendo estar contaminada com tecido ou pele, e é diminuída proporcionalmente ao tempo prolongado do sangramento e da ordenha da cauda.

Podem ser utilizadas agulhas de pequeno calibre ou realizar a canulação das veias[31].

O primeiro passo é colocar o animal em um contensor ou anestesiá-lo. Em seguida, passa-se uma gaze com álcool 70%. A cauda deve ser aquecida, para que ocorra uma vasodilatação. Esse aquecimento pode ser feito com uma lâmpada quente ou até mesmo mergulhado-se a cauda em água quente (em torno de 35 °C). Localiza-se uma das veias laterais da cauda e, com o bisel virado para cima, quase paralelo à veia, introduz a agulha cerca de 2 mm na veia (Figura 23).

Para pequenos volumes, pode-se proceder à amputação da cauda de cerca de 1 mm em camundongos e de 2 mm em ratos. Para medir a glicemia, na qual é necessária apenas uma gota de sangue, pode-se dar um pique com uma agulha (de insulina ou 22G), como é feito no dedo indicador de humanos[17,19].

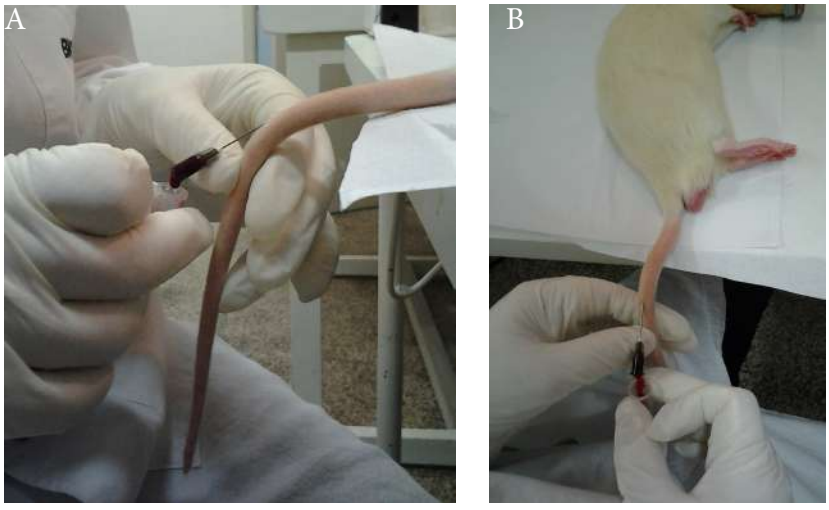



Figura 23. A e B) Coleta de sangue da veia caudal do rato

## Veia jugular

Essa via é limitada a ratos, sendo o volume obtido de médio a grande com uma boa qualidade da amostra.

O animal deve ser primeiramente anestesiado e contido de forma que permaneça com

a cabeça para cima. O pelo do pescoço (local da punção) pode ser retirado ou molhado com álcool 70%.

Com o pescoço distendido, localiza-se a veia jugular e retira-se o sangue com uma seringa de 1 mL, inserindo a agulha de 1 mm a 3 mm de profundidade[19,20].

## Coleta de sangue terminal com anestesia profunda

### Punção cardíaca

Esse procedimento pode ser realizado tanto em ratos como em camundongos. Obtém-se uma boa quantidade de sangue, formada por uma mistura de sangue arterial e venoso (Anexo 21).

Após a anestesia profunda dos animais, verificada com o teste de sensibilidade a estímulos dolorosos, coloca-se o animal em decúbito dorsal e passa-se uma gaze embebida em álcool 70% por toda a extensão do seu tronco. Desliza-se o dedo polegar sobre o tronco do animal, até não ser mais possível sentir a cartilagem xifoide. Em seguida, introduz-se a agulha em um ângulo de 45° com uma leve inclinação para a esquerda.

Quando uma mancha de sangue aparecer, puxa-se o êmbolo devagar; o sangue fluirá sozinho, não sendo necessário puxá-lo com força[22,31] (Figura 24).

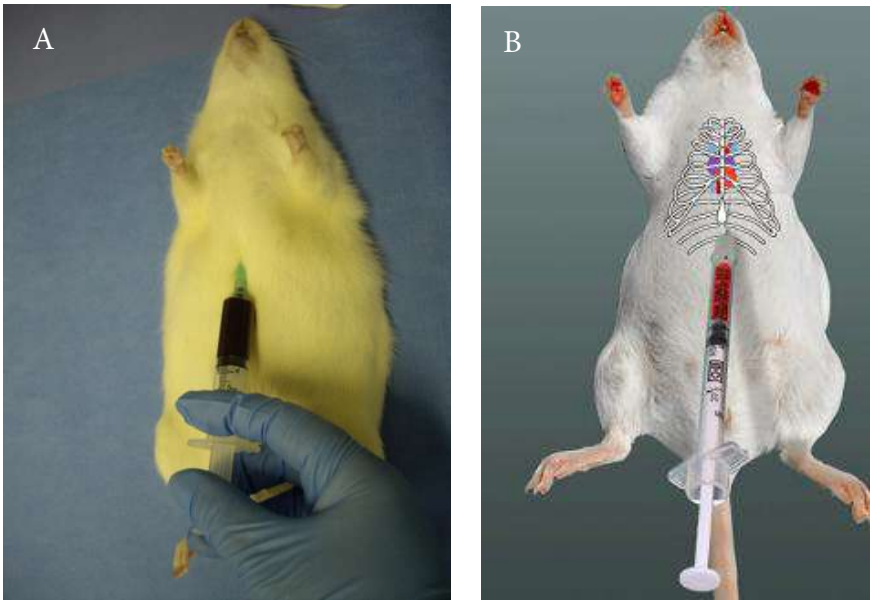



Figura 24. A) Punção cardíaca em rato; B) Localização do coração no rato (Fonte: Disponível em: http://www.theodora.com/rodent_laboratory/blood_collection.html)

## Aorta abdominal

Após a anestesia profunda, coloca-se o animal em decúbito dorsal, prendendo suas patas com agulhas, como nos procedimentos cirúrgicos. Descontamina-se toda a extensão do tórax e do abdome do animal com álcool 70%. Em seguida, procede-se à abertura da pele e, depois, do peritônio, prendendo-o com agulhas. Os órgãos da região do abdome são afastados para o lado, para ser possível localizar a veia. Coloca-se a agulha com delicadeza na veia, para não estourar, puxando-a devagar[19,20] (Figura 25).

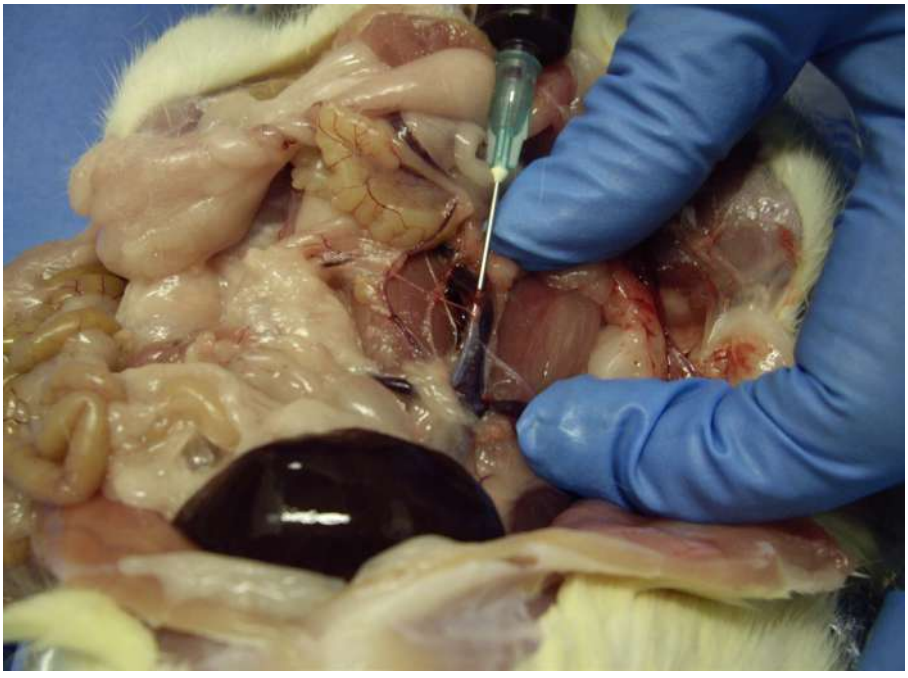


Figura 25. Punção da aorta abdominal de rato

## Venossecção (via axilar)

Coleta-se o sangue dos vasos axilares, colocando-se o animal anestesiado em uma superfície lisa. Depois, estendem-se os seus membros, fixando-os com uma agulha.

Faz-se uma incisão profunda na axila do animal, na parte lateral do tórax, segurando a pele na parte posterior da incisão com uma pinça, para criar uma concha na região. O sangue é coletado com o auxílio de pipetas[19,20].

## COELHOS

O Biotério dispõe de uma sala para a manutenção de coelhos convencionais controlados (com microbiota indefinida) e uma sala para procedimentos de inoculação e coleta de sangue. Os coelhos são adquiridos de granjas ou de outros biotérios de produção pelos pesquisadores (Anexo 19).

Os animais são utilizados para a produção de anticorpos policlonais[21,24]. Nesse caso, a idade ideal do animal é de aproximadamente três meses, e o pesquisador deve entregar ao responsável da seção o protocolo de experimentação (Anexo 23) previamente preenchido, o comprovante da origem do animal e o número de aprovação na Ceua.

Os procedimentos utilizados em coelhos no Biotério são inoculação e coleta de sangue.

### Inoculação

A via de inoculação utilizada é a subcutânea, e o antígeno a ser inoculado deve ser purificado, estar livre de toxicidade[21], ter pH fisiológico, estar estéril e estar na concentração adequada (Figura 26).

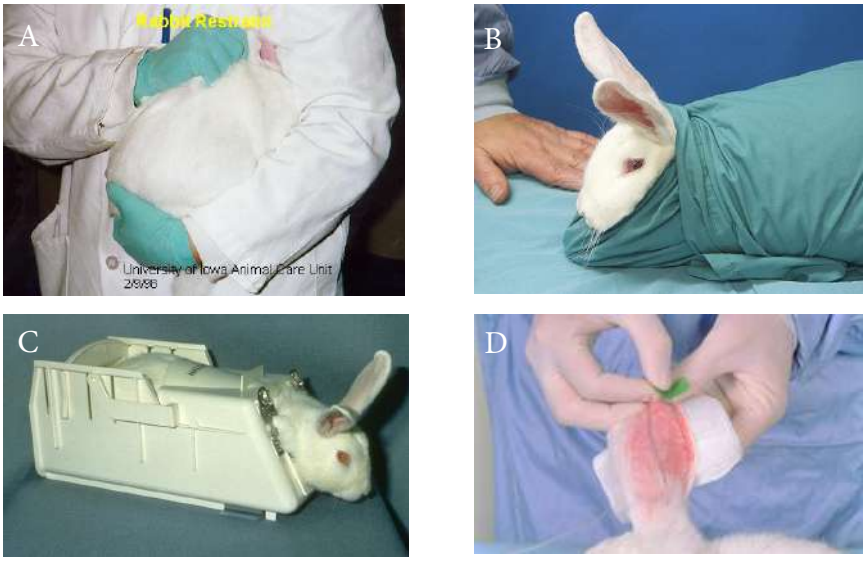



Figura 26. A) Contenção manual para transporte de coelho (Fonte: Disponível em: http://research.uiowa.edu/animal/print.php?get=rabbit>); B e C) Técnicas de contenção para procedimentos de coleta ou inoculação endovenosa (Fontes: http://www.ahwla.org.uk/site/tutorials/BVA/BVA08-Rabbit/Rabbit.html e http://ehs.uc.edu/lams/data/Rabbits/9004/images/lg/04_27.jpg)

## Coleta de sangue

A via de escolha são os vasos auriculares, e a quantidade de sangue coletada para o pré-imune e a posterior checagem da quantidade de anticorpos é de 3 mL a 5 mL. Para a coleta de sangue final, são retirados de 15 mL a 30 mL, também pela via auricular (Figura 27).

No final do experimento, os animais são eutanasiados por método químico de overdose por anestésicos injetáveis (Anexo 6).

Figura 27. http://www.nc3rs.org.uk/bloodsamplingmicrosite/page.asp?id=348

## ANESTESIA E ANALGESIA DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

A preocupação com o bem-estar dos animais utilizados na pesquisa científica tem aumentado significativamente, tanto com o intuito de diminuir a dor e o sofrimento animal como também para melhorar a qualidade dos resultados experimentais. Na condução de experimentos que envolvem animais, muitas vezes há algum tipo de desconforto, que deve ser minimizado ao máximo. A utilização de protocolos eficientes de anestesia e analgesia garante o refinamento dos projetos de pesquisa diminuindo a angústia, a dor e o sofrimento animal.

Existe uma gama de agentes anestésicos e analgésicos disponíveis para uso em animais de laboratório, contudo considerações criteriosas devem ser feitas para a escolha do melhor agente, visto que a seleção de determinado agente anestésico ou técnica anestésica dependerá de vários fatores, alguns deles relacionados diretamente às interações potenciais com o protocolo de pesquisa e a sua capacidade de produzir a adequada profundidade anestésica. Também devem ser levados em consideração alguns fatores práticos, como a experiência do pessoal envolvido e a disponibilidade dos equipamentos necessários.

Independentemente do método escolhido, deve-se ter em mente que os dois objetivos principais da anestesia são evitar a dor e proporcionar contenção humanitária [44]. Portanto, o agente anestésico escolhido deve ser aquele que cause o mínimo de sofrimento e desconforto para o animal.

A seleção de um método de anestesia que apresente menor probabilidade de interferir em determinado protocolo de pesquisa talvez seja uma das tarefas mais difíceis. O pesquisador deve ter conhecimento dos efeitos fisiológicos que tais anestésicos proporcionam, para tentar minimizar interações entre a técnica anestésica e o protocolo de pesquisa. É importante ter em mente que nenhum agente anestésico é ao mesmo tempo totalmente efetivo e seguro.

A simples adoção de um método de anestesia, descrito nas publicações que tratam com o mesmo modelo animal de interesse, não garante o sucesso da técnica. A proposta é que seja realizada primeiramente uma avaliação do anestésico escolhido e, depois, da interação do anestésico com o modelo animal e com o protocolo de pesquisa. Muitas vezes o projeto-piloto facilita a padronização da técnica anestésica.

Há uma relutância em refinar metodologias anestésicas, porque se acredita que os anestésicos usados na nova técnica poderão afetar o modelo animal escolhido e o período do pós-cirúrgico. Em alguns casos, essa crença é verídica e tem base científica, porém devem ser ponderados os efeitos da anestesia em comparação com os efeitos do estresse cirúrgico.

As preocupações são semelhantes quanto à utilização de analgésicos no pós-cirúrgico e, mais uma vez, os efeitos colaterais dos analgésicos devem ser considerados em conjunto com os efeitos do estresse e da dor no período pós-cirúrgico.

Para a escolha da melhor técnica anestésica, alguns questionamentos relevantes devem ser realizados (Quadro 5).

Quadro 5. Questionamentos para a seleção de técnicas anestésicas em animais de laboratório

| |
|---|
| ✓ Qual é a duração e a profundidade da anestesia desejada? |
| ✓ Qual é o grau de analgesia produzido? |
| ✓ A qualidade da anestesia é satisfatória? |
| ✓ Há interações específicas com o protocolo experimental? |
| ✓ Existem requisitos legais e/ou regulamento para controle de narcóticos? |
| ✓ É uma técnica de fácil realização? |
| ✓ É confiável e reprodutível? |
| ✓ É reversível? |
| ✓ O operador está familiarizado com a técnica? |
| ✓ Qual é o custo do procedimento? |
| ✓ Todos os agentes químicos relacionados com a técnica estão disponíveis? |

Fonte: Adaptado de Flecknell[29].

## Terminologia básica[29,37,48]

**AINES** (Anti-inflamatórios Não Esteroidais): categoria de analgésicos.

**Analgesia**: caracterizada como o estado de diminuição ou eliminação temporária da sensação de dor.

**Anestesia**: caracterizada como o estado reversível e temporário de redução ou eliminação de respostas motoras e sensoriais.

**Anestesia dissociativa**: tipo de anestesia em que ocorre a dissociação do córtex cerebral pelo anestésico, ocorrendo analgesia, porém sem a perda dos reflexos protetores.

**Anestesia geral**: é o estado anestésico reversível obtido com agentes inalatórios e/ou injetáveis, que satisfaz as seguintes condições: perda da consciência (narcose); abolição da dor (analgesia); relaxamento muscular.

**Anestesia local**: procedimento anestésico de uma região do corpo.

**Anóxia**: ausência de oxigênio no organismo, principalmente no cérebro.

**Anticolinérgico**: que inibe a produção de acetilcolina (neurotransmissor).

**Bradicardia**: diminuição da frequência cardíaca.

**Bradipneia**: diminuição da frequência respiratória.

**Dor**: resposta sensorial provocada pela geração de um estímulo desagradável.

**Hipertermia**: aumento da temperatura corporal.

**Hipotermia**: diminuição da temperatura corporal.

**Hipóxia**: baixo teor de oxigênio no organismo.

**IM**: via intramuscular de administração de substâncias.

**IP**: via intraperitoneal de administração de substâncias.

**IV**: via intravenosa de administração de substâncias.

**MPA**: medicação pré-anestésica.

**Opioides**: categoria de analgésicos.

**Parassimpatolítico**: que inibe a ação do sistema parassimpático.

**SC**: via subcutânea de administração de substâncias.

**Sedação**: estado em que o animal está acordado e calmo, havendo uma leve depressão do Sistema Nervoso Central.

**Taquicardia**: aumento da frequência cardíaca.

**Taquipneia**: aumento da frequência respiratória.

**VO**: Via oral de administração de substâncias.

## Planejamento e cuidados

Em todas as situações em que seja necessário anestesiar um animal, é muito importante que o pesquisador planeje e efetivamente coloque em prática os cuidados adequados antes, durante e depois de cada procedimento. O uso de agentes anestésicos altera significativamente a fisiologia do animal e, sem os cuidados necessários e o devido planejamento, o resultado pode ser desastroso.

O grau das alterações causadas varia, porém todo agente anestésico gera hipotermia[17] e diminuição das atividades cardiovascular (bradicardia) e respiratória (bradipneia). Após o procedimento, essas alterações persistem até a recuperação do animal, e por isso é necessário o cuidado com o animal imediatamente após o procedimento e, em alguns casos, por mais alguns dias depois. O tempo de recuperação do animal varia conforme o agente utilizado.

## Pré-procedimento

Antes de iniciar um procedimento em que haja necessidade do uso de agentes anestésicos ou sedativos, os pesquisadores devem avaliar alguns fatores:

- ✓ Fatores relacionados ao animal – idade; sexo; espécie; temperamento; linhagem; *status* sanitário;
- ✓ Fatores relacionados ao procedimento – devem-se considerar: a técnica selecionada e a duração do procedimento; o grau de dor/desconforto que o procedimento possa causar no animal; o treinamento das pessoas envolvidas;
- ✓ Fatores relacionados ao laboratório – considerar se o ambiente e os materiais disponíveis são adequados para a realização do procedimento;
- ✓ Fatores relacionados ao período pós-procedimento – os anestésicos podem causar efeitos indesejáveis no animal. Nos casos em que o procedimento não é terminal, ou seja, o animal deve recuperar-se da anestesia, é importante conhecer quais serão os efeitos esperados da administração do anestésico escolhido.

Dependendo do caso, é necessária a administração, antes do início do procedimento, de medicamentos como antibióticos (quando há a necessidade de minimizar o risco de infecção no pós-operatório) e analgésicos.

Deve-se lembrar que, antes de iniciar qualquer procedimento com os animais, reservar pelo menos sete dias (preferencialmente quatorze dias) para a aclimatização ao novo

ambiente (Capítulo 3), mesmo que o animal tenha apenas mudado de uma seção para outra dentro do mesmo biotério.

Em roedores e coelhos, a restrição alimentar não é necessária[39], pois a anatomia do estômago dessas espécies impede que eles vomitem[37]. A restrição alimentar deve ocorrer somente se for realmente necessária e estiver especificada no protocolo de pesquisa aprovado na Ceua da instituição. No caso da oferta de água, a restrição deve ocorrer pelo menos 60 minutos antes da indução anestésica[29,37].

Nos casos em que seja necessária a restrição de alimentos, deve-se considerar que os roedores realizam a coprofagia (ingestão de fezes). Mesmo adotando-se medidas para evitá-la durante o período de restrição, como a utilização de gaiolas metabólicas, o animal é capaz de retirar as fezes diretamente do ânus[44] (Capítulo 3).

Se possível, deve-se pesar o animal antes do procedimento anestésico, não apenas para a garantia do cálculo correto da dosagem dos agentes, mas também para acompanhar a perda de peso que ocorre inevitavelmente no período pós-cirúrgico. No caso de perda de 10% a 15% do peso corporal do animal em poucos dias, recomenda-se a eutanásia, indicada também quando a perda total chegar a 20% do peso corporal.

Avaliar o *status* corporal é uma boa maneira de avaliar as condições de saúde do animal no pós-cirúrgico e em outras situações experimentais na definição do *endpoint*. Para realizar essa avaliação, deve-se pegar o camundongo ou rato e colocá-lo em cima da tampa da gaiola. Ao passar os dedos pelos ossos pélvicos (quadril), a condição corporal pode ser então avaliada em uma escala de 1 a 5[45,46].

Descrição dos valores referentes à avaliação:

5: O animal está obeso, e os ossos não podem ser sentidos;

4: O animal está acima das condições normais, e os ossos são pouco sentidos;

3: O animal está em ótimas condições. Os ossos são palpáveis, mas não estão proeminentes;

2: O animal está ficando magro, e os ossos estão proeminentes. Divide-se essa categoria em +2, 2 e -2, sendo a eutanásia recomendada no último caso (-2);

1: A perda de massa muscular está avançada, não há deposição de gordura, e os ossos estão muito proeminentes. A eutanásia é obrigatória nesse caso.

## Durante o procedimento

Durante o procedimento experimental, deve-se atentar para os seguintes cuidados:

- ✓ Manter a esterilidade do ambiente;
- ✓ Manejar os tecidos com cuidado, pois, dessa forma, a dor após o procedimento cirúrgico é reduzida, assim como o risco de desenvolvimento de infecções;
- ✓ Repor a perda de fluidos (administrar o fluido aquecido, para prevenir uma queda brusca na temperatura do animal – Tabela 2);
- ✓ Manter o animal aquecido (usando placas aquecedoras, bolsa térmica, lâmpada, plástico-bolha etc.), pois, como tem o corpo pequeno, perde calor com mais facilidade. Também se deve atentar para que o animal não fique com hipertermia[17];
- ✓ Levar em consideração as particularidades anatômicas e as indicações e contraindicações de anestésicos de acordo com a espécie;
- ✓ Evitar o ressecamento dos olhos pelo contato excessivo com o ar, aplicando um gel/pomada protetor estéril durante o período em que o animal estiver anestesiado.

Tabela 2. Volumes aproximados para a fluidoterapia em ratos e camundongos

| Espécie/via | Subcutânea (mL) | Intraperitoneal (mL) |
|---|---|---|
| Rato (200 g) | 5 | 5 |
| Camundongo (30 g) | 1-2 | 2 |

Fonte: Adaptado de Flecknell[29].

## Cuidados pós-procedimento

Ao término do procedimento, é necessária uma monitoria para o adequado suporte pós-operatório dos animais:

- ✓ Manter os animais separadamente em recuperação, em caixas com toalha de papel estéril em vez de maravalha, pois esta pode aderir à ferida cirúrgica ou ao nariz e à boca do animal;
- ✓ As gaiolas devem ser expostas a pouca luz, evitando-se a manipulação e o estresse do animal;
- ✓ Procurar manter o animal aquecido, para, assim ajudá-lo em sua recuperação. Ratos e camundongos são espécies bastante suscetíveis a hipotermia. A temperatura do

ambiente deve variar de 27 °C a 30 °C para adultos e de 35 °C a 37° C para os neonatos até o restabelecimento dos parâmetros normais[29];

- ✓ Não retornar os animais à sala antes de ter certeza de que todos se recuperaram da anestesia;
- ✓ Monitorar os animais por aproximadamente uma semana para detectar sinais de doenças e infecção. Entre os sinais de infecção estão vermelhidão, inchaço, presença de secreção, dor e perda dos pontos com abertura da incisão[40];
- ✓ Os animais devem ser monitorados pelo menos uma vez ao dia, para avaliar a presença de dor no pós-procedimento[36];
- ✓ Considerar que, após a cirurgia, o animal diminuirá o consumo de água e ração. Isso pode ser resolvido facilitando seu acesso à alimentação e à hidratação, bem como providenciando analgesia adequada.

Como a ingestão de água nesse período diminui, ocorre facilmente a desidratação do animal. A administração de fluido estéril e aquecido por via subcutânea é um meio de melhorar a recuperação do animal. Pode ser utilizada solução fisiológica ou glicofisiológica pelas vias oral, subcutânea ou intraperitoneal (Tabela 2)[29,39].

Caso o animal demore a retornar da anestesia, é recomendado reaplicar a pomada oftálmica, para evitar o ressecamento dos olhos.

Finalmente, deve-se sempre considerar o controle da dor por meio da administração de analgésicos[17].

## Medicação pré-anestésica

Antes do procedimento anestésico, há a possibilidade de administrar uma medicação pré-anestésica (MPA). Esse método consiste na aplicação de qualquer medicamento em um período que antecede a anestesia com a finalidade de aumentar a segurança e a qualidade do ato anestésico. Isso se aplica a todas as espécies animais, porém sua utilização é mais comum em espécies de maior porte[29]. Esse procedimento proporciona analgesia e sedação, reduz o estresse antes da anestesia, propicia uma melhor indução anestésica, minimiza eventuais efeitos indesejáveis durante o procedimento, como aumento de salivação e secreções brônquicas, potencializa o efeito do agente, diminuindo a dose anestésica, e permite uma recuperação melhor e mais rápida do animal[17,23,37,43,44].

No caso de procedimentos menos invasivos, a anestesia geral não é necessária, sendo possível utilizar apenas sedativos ou tranquilizantes[17].

Os grupos farmacológicos mais comumente utilizados como MPA são os seguintes:

- ✓ Fármacos anticolinérgicos (exemplo: atropina) podem promover um aumento discreto dos batimentos cardíacos (taquicardia). Sua utilização visa reduzir a salivação e a secreção bronquial[17,44].
- ✓ Fármacos hipnoanalgésicos (exemplos: morfina, tramadol) têm ação analgésica forte, pois causam depressão do sistema nervoso central, elevando o limiar da dor.
- ✓ Fármacos hipnóticos (exemplos: etomidato e hidrato de cloral) têm ação analgésica muito pequena. Apenas promovem um estado de sono no animal.
- ✓ Fármacos tranquilizantes (exemplos: acepromazina, diazepan) não produzem estado de sedação, porém acalmam o animal, pois levam à perda ou à redução da consciência[17]. A analgesia que proporcionam é discreta[44], não permitindo intervenções muito invasivas. Os tranquilizantes são divididos nos grupos das fenotiazinas (exemplo: acepromazina), butirofenonas (exemplo: droperidol) e benzodiazepínicos (exemplo: diazepan).
- ✓ Fármacos alfa-2-agonistas (exemplo: xilazina). A xilazina é utilizada em animais de laboratório principalmente associada ao agente anestésico cetamina. Pode ser administrada pelas vias subcutânea, intraperitoneal, intramuscular ou endovenosa. De ação sedativa, promove o relaxamento muscular e a analgesia visceral. Tem como efeitos adversos a depressão respiratória e cardiovascular[37].

Os Quadros 6 e 7 mostram alguns exemplos de agentes e as respectivas dosagens e efeitos esperados.

Quadro 6. Agentes pré-anestésicos em ratos

| Droga | Dosagem | Observações |
|---|---|---|
| Acepromazina | 2,5 mg/kg IM/IP | Sedação |
| Atropina | 0,05 mg/kg IP/SC | Parassimpatolítico |
| Diazepan | 2,5-5,0 mg/kg IM/IP | Sedação |
| Cetamina | 50-100 mg/kg IM/IP | Sedação/imobilização |
| Medetomidine | 0,03-0,1 mg/kg IP/SC. | Sedação/analgesia leve |
| Midazolan | 5 mg/kg IP | Sedação |
| Xilazina | 1-5 mg/kg IM/IP. | Sedação/analgesia leve |

Fonte: Adaptado de Sharp[41]. Legenda: IM – intramuscular, IP – intraperitoneal, SC – subcutânea.

Quadro 7. Agentes pré-anestésicos em camundongos

| Droga | Dosagem | Observações |
|---|---|---|
| Acepromazina | 2,5 mg/kg IP/SC | Sedação leve |
| Atropina | 0,04 mg/kg SC | Anticolinérgico |
| Diazepan | 5,0 mg/kg IM/IP | Sedação leve |
| Cetamina | 100-200 mg/kg IM | Sedação profunda Analgesia leve a moderada |
| Medetomidine | 30-100 µ g/kg IP/SC. | Sedação e analgesia leve a moderada |
| Midazolan | 5 mg/kg IP/IM | Sedação leve a moderada |
| Xilazina | 5-10 mg/kg IP | Sedação leve/analgesia leve a moderada |

Fonte: Adaptado de Flecknell[29]. Legenda: IM – intramuscular; IP – intraperitoneal; SC – subcutânea.

## Anestesia

O objetivo da utilização de anestésicos nos ratos e camundongos de laboratório é garantir uma contenção química humanitária e prevenir a dor, obtendo adequado relaxamento muscular e analgesia para a realização dos diferentes procedimentos experimentais conduzidos no Biotério[44]. Assim, a anestesia deve ser realizada, em animais de laboratório, sempre que o procedimento lhes cause dor ou desconforto. Para minimizar a dor e o desconforto, devem ser utilizadas drogas anestésicas, analgésicas, tranquilizantes e, ainda, a eutanásia.

O plano anestésico a ser induzido depende do procedimento e da necessidade de supressão da dor percebida pelo animal. Assim, em procedimentos menos invasivos, que incluem a administração de fluidos, imunização, medicação oral, é suficiente apenas a contenção do animal, realizada por pessoa treinada e experiente, ou, se necessário, anestesia local. Já no caso de um procedimento mais invasivo (cirurgias, agentes que envolvem inflamação excessiva e necrose, bem como coleta de sangue via punção cardíaca, retro-orbitral e aorta abdominal), é necessário suprimir completamente a percepção dos estímulos dolorosos utilizando-se agentes analgésicos[29] e anestésicos.

Para a obtenção dos diversos planos de anestesia, há diferentes técnicas, utilizando-se um ou mais agentes anestésicos[29,44]. No Biotério da FCF-IQ/USP, as técnicas mais utilizadas são a anestesia injetável dissociativa com cetamina associada com xilazina e a anestesia inalatória com isoflurano. Entre elas, a inalatória é considerada a técnica mais segura, por ter maior margem de segurança e proporcionar um plano cirúrgico de anestesia mais estável[37].

Para verificar a profundidade da anestesia, o pesquisador deve avaliar a presença ou a ausência de determinados sinais, como reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e as alterações das frequências cardíaca e respiratória, que sofrem modificações de acordo com os planos anestésicos atingidos (profundidade da anestesia)[17]. A respiração do animal deve ser profunda e regular. Se houver reflexo presente, ou seja, se o animal responder a estímulos, a anestesia não está no plano anestésico adequado para a intervenção cirúrgica.

A anestesia geral injetável é um procedimento mais delicado, pois causa importantes variações fisiológicas no animal, tornando a indução e a recuperação anestésicas lentas e com longos períodos de efeitos residuais das drogas no organismo do animal[35].

## Anestesia injetável

No caso de ratos e camundongos, a via mais utilizada para anestesia injetável é a intraperitoneal, pois a via endovenosa é de difícil acesso nessas espécies em razão do tamanho. Com a utilização dessa via, contudo, não é possível administrar o anestésico gradualmente como no acesso endovenoso. Portanto, ao utilizar essa via, administra-se uma dose única mais alta[44], calculada previamente. Como as variações entre as linhagens e até mesmo entre os gêneros resultam em respostas diferentes aos anestésicos, recomenda-se optar por agentes ou pela combinação de agentes que apresentem maior margem de segurança[29,44].

Quando a anestesia a ser utilizada é injetável, há alguns fatores a serem considerados, como o local de administração, o método, o volume, se o composto é irritante e a necessidade de diluição.A cetamina ou quetamina é um anestésico injetável que induz a um estado de anestesia dissociativa. Na anestesia dissociativa, ocorre a dissociação com o córtex cerebral, na qual o animal fica em estado de analgesia e “desligamento” sem, contudo, perder os reflexos protetores[29].

Os efeitos esperados da administração de cetamina em ratos e camundongos envolvem: imobilidade com aumento de tônus muscular; estabilidade de função respiratória; analgesia variável, porém não adequada para cirurgia em camundongos; estímulo de parâmetros cardiovasculares; aumento do fluxo sanguíneo cerebral; aumento da pressão intracraniana; e aumento da pressão intraocular. O agente utilizado isoladamente não produz um efeito anestésico adequado em ratos e camundongos[17].

Para relaxar a musculatura em razão do aumento do tônus muscular e aumentar a duração da anestesia, pode-se utilizar a cetamina associada com agentes sedativos, como diazepan ou acepromazina. Nesse caso, a analgesia gerada é leve, não sendo suficiente para um procedimento cirúrgico, mas adequada para procedimentos menos invasivos e dolorosos[29].

Se houver a necessidade da obtenção de um plano anestésico moderado para realizar procedimentos relativamente dolorosos, pode-se combinar a cetamina com um alfa-2-agonista como a xilazina. Esses medicamentos promovem melhor analgesia e relaxamento muscular, porém causam severa hipotermia e depressão cardiovascular e respiratória. Tais efeitos podem ser revertidos com a utilização de agentes antagonistas, porém, com a aplicação destes, perdem-se também a analgesia e o relaxamento muscular obtidos.

A utilização de agentes antagonistas ocorre quando o animal aparenta ter alguma reação adversa ao agente, se recebeu uma dose muito grande de anestésico ou quando o procedimento já foi concluído[17]. Na anestesia injetável, é comum utilizar a combinação de mais de um agente.

A Tabela 3 apresenta uma sugestão de protocolo para a realização de anestesia dissociativa em ratos e camundongos. As drogas deverão ser administradas na mesma seringa. No Quadro 8, encontra-se uma sugestão de protocolo de diluição para o preparo de anestesia a ser administrada em um número maior de animais.

Quadro 8. Diluição de cetamina e xilazina para anestesia injetável

**Rato**

✓ A quantidade calculada abaixo é suficiente para um peso corporal de 1.000 g, ou seja, aproximadamente 4 a 5 ratos adultos

✓ 75 mg/kg cetamina + 10 mg/kg xilazina IP

✓ 0,75 mL (75 mg) cetamina + 0,5 mL (10 mg) xilazina + 0,75 mL água para injeção

✓ Obtêm-se 4-5 doses de 0,2 mL/100 g

**Camundongo**

✓ A quantidade calculada abaixo é suficiente para um peso corporal de 500 g, ou seja, aproximadamente 15 a 20 camundongos adultos

✓ 100 mg/kg cetamina + 10 mg/kg xilazina IP

✓ 0,5 mL (75 mg) cetamina + 0,25 mL (5 mg) xilazina + 4,25 mL água para injeção

✓ Obtêm-se aproximadamente 17 doses de 0,1 mL/10 g

IP – intraperitoneal

Fonte: Adaptado de Flecknell[29].

Tabela 3. Protocolo anestésico de cetamina e xilazina em ratos e camundongos

| Espécie | Cetamina | Xilazina | Duração da anestesia | Efeito |
|---|---|---|---|---|
| Rato | 75-100 mg/kg IP | 10 mg/kg IP | 20-30 min | Anestesia cirúrgica |
| Camundongo | 80-100 mg/kg IP | 10 mg/kg IP | 20-30 min | Anestesia cirúrgica |

Fonte: Adaptado de Flecknell[29]. IP – intraperitoneal.

## Anestesia inalatória

A utilização da anestesia inalatória depende de equipamentos específicos e treinamento técnico, porém é o método mais adequado para realizar procedimentos cirúrgicos, inclusive procedimentos de longa duração em ratos e camundongos (Anexo 20). No Biotério, os pesquisadores dispõem de um aparelho de anestesia inalatória, instalado próximo a uma fonte de gás oxigênio e utilizado dentro de uma capela de exaustão de ar, para maior segurança do operador (Figura 28).

Figura 28. Aparelho de anestesia inalatória

Durante a administração da anestesia inalatória, deve-se observar o *status* de saúde do animal, principalmente se este não aparenta ter alguma doença no trato respiratório, o que pode interferir na administração do agente[39].

A indução do animal para a anestesia inalatória é realizada colocando-o dentro de uma câmara de indução. Essa câmara recebe o agente anestésico inalatório na concentração adequada com gás oxigênio através do aparelho de anestesia inalatória (Tabela 4). Assim que o animal estiver anestesiado, é removido da câmara e a anestesia é mantida utilizando-se uma máscara facial proporcional ao seu tamanho e adequada à espécie que está sendo utilizada. É importante administrar ao animal o agente analgésico escolhido antes da realização do procedimento, pois o retorno do animal da anestesia é quase imediato quando a máscara é retirada. Para grandes cirurgias é possível ainda combinar a anestesia injetável com a inalatória.

No Biotério, o agente anestésico inalatório comumente utilizado é o isoflurano. Entre as vantagens e desvantagens da utilização desse agente, é possível citar as seguintes[29,42]:

**Vantagens**: rápida indução e recuperação da anestesia; apresenta menores efeitos sobre os parâmetros cardiovasculares quando comparados com os do halotano, outro agente anestésico inalatório; bom relaxamento muscular.

**Desvantagens**: alto custo; por ser um gás, há a necessidade de utilização dentro de uma capela, para a segurança do operador; aumento de secreções nas vias aéreas; necessita de monitoria mais delicada, pois pode alterar o plano anestésico rapidamente, ocorrendo overdose.

No final de uma anestesia prolongada, recomenda-se administrar ao animal oxigênio puro por aproximadamente 5 a 10 minutos, para evitar hipóxia[44].

Tabela 4. Concentração do isoflurano para anestesia inalatória de camundongos e ratos

| Anestésico | Fase da anestesia | |
|---|---|---|
| Isoflurano | Indução | 3-4% |
| | Manutenção | 1-2% |

Fonte: University of South Florida[37].

## Dor

Acreditava-se no passado que os animais não eram capazes de sentir dor. Hoje, sabe-se que eles sentem dor, porém é difícil reconhecer essa dor e saber o grau de dor que o animal

está sentindo. Essa dificuldade é baseada no fato de que os animais não têm a capacidade de nos falar o que sentem e que, por meio de um mecanismo instintivo de sobrevivência, escondem a dor para não serem presas vulneráveis[35].

Exceto em estudos justificados sobre a pesquisa da dor, nos demais procedimentos e estudos a dor deverá sempre ser minimizada[35]. Deve-se identificar sua causa e eliminá-la/aliviá-la com o uso de analgésicos. A melhora do manejo e alojamento e a observação constante do animal para reavaliação da dor complementam o manejo da dor, em conjunto com o uso de analgésicos.

Em ratos e camundongos, os sinais indicativos de dor envolvem alterações no comportamento normal da espécie, tais como postura arqueada, vocalização ao ser manuseado, piloereção e perda de peso. O Quadro 9 mostra os sinais indicativos de dor em ratos, camundongos e coelhos.

Quadro 9. Sinais potenciais associados a dor ou desconforto em ratos, camundongos e coelhos

| **Sinais** | **Camundongos** | **Ratos** | **Coelhos** |
|---|---|---|---|
| Diminuição no consumo de água e alimento | X | X | X |
| Perda de peso | X | X | X |
| Isolamento social | X | X | X |
| Automutilação, mordedura de membros | X | X | X |
| Respiração acelerada | X | X | X |
| Respiração com a boca aberta | X | X | X |
| Respiração abdominal | X | X | X |
| Ranger de dentes | | X | X |
| Mordidas/agressão | | X | X |
| Aumento/diminuição de movimentos | X | X | X |
| Aparência da pelagem (eriçada, emaranhada, opaca) | X | X | X |
| Postura anormal | X | X | X |
| Sono agitado | | | X |
| Lacrimejamento/porfirina, falta do reflexo de pisca. | | X | X |
| Pupilas dilatadas | | | X |
| Rigidez muscular/falta de tônus muscular | X | X | X |
| Desidratação/olhos fundos | X | X | X |
| Espasmos/tremores | X | X | X |
| Vocalização (raro) | X | X | X |
| Vermelhidão ou inchaço ao redor da ferida cirúrgica | X | X | X |
| Aumento da salivação | | | X |

Fonte: Adaptado de *National Institute of Health*[36].

## Estresse

O estresse foi definido como o efeito de fatores físicos, fisiológicos ou emocionais que induzem a uma alteração na homeostase do animal[32,38]. A homeostase é o equilíbrio fisiológico normal do corpo[47]. O estresse e suas consequências podem ser divididos em três tipos[32]:

- ✓ **eustresse** é o estresse "bom", benéfico para o animal. Ocorre quando o animal sofre um estímulo não doloroso e a partir daí tem início uma resposta adaptativa a esse estímulo;
- ✓ **estresse neutro** é aquele em que ocorre um estímulo causador de estresse que não é nem prejudicial nem benéfico para o animal [38];
- ✓ **distresse** ocorre quando o animal sofre um estímulo que prejudica seu bem-estar.

Para a avaliação do estresse, devem-se utilizar de preferência métodos não invasivos. Os parâmetros utilizados na avaliação do estresse incluem alterações comportamentais, sintomas clínicos, aspectos fisiológicos, indicadores bioquímicos, achados patológicos e indicadores imunológicos.

Vale destacar que, ao se avaliar o estresse, é preferível utilizar sempre mais de um desses parâmetros[32].

## Analgesia

Para garantir o bem-estar animal após a realização do procedimento cirúrgico, o pesquisador deve avaliar em seu protocolo a possibilidade de utilização de um agente analgésico. O uso de analgésicos **sempre** deve ser considerado quando são realizados procedimentos cirúrgicos invasivos, para aliviar a dor pós-operatória imediata e em longo prazo[17].

Para realizar adequado manejo da dor e estresse do animal, é preciso conhecer o comportamento normal (Capítulo 3) da espécie e o comportamento relacionado à dor[36]. O reconhecimento da dor em animais é difícil; por isso, na dúvida, deve-se considerar que, se o procedimento é passível de causar dor no humano, também é passível de causar dor no animal[18]. Dessa forma, é preciso pensar em maneiras para o alívio potencial da dor[35].

No âmbito da pesquisa, é vantajoso promover o alívio da dor, pois o animal com dor

sofre alterações patofisiológicas que podem influenciar os resultados dos experimentos. Além disso, ao promover o alívio da dor trabalha-se de acordo com a legislação e com princípios éticos e humanitários[35,36].

Há muitos agentes analgésicos disponíveis para realizar o devido cuidado pós-operatório com o animal, considerando-se que existem procedimentos experimentais mais invasivos que outros, causando diferentes graus de dor no animal. O Quadro 10 classifica a dor pós-procedimento como leve, moderada ou severa, de acordo com o tipo de procedimento realizado. Já o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) classifica os experimentos em grau de invasividade 1 a 4 (Resolução Normativa nº 4).

Quadro 10. Potencial de dor no pós-procedimento

| Mínima a leve | Leve a moderada | Moderada a severa |
|---|---|---|
| Implantação de cateter | Laparotomia (pequenas incisões) | Laparotomia (maiores incisões) e incisões de órgãos |
| Corte da cauda | Tireoidectomia | Toracotomia |
| Marcação na orelha | Orquidectomia | Transplante de órgãos |
| Colocação de *transponder* subcutâneo | Cesariana | Procedimentos vertebrais |
| Implantação de tumor superficial | Hipofisectomia | Procedimentos de queimadura |
| Venotomia de seio orbital | Timectomia | Modelos de trauma |
| Transferência de embriões em roedores | Transferência de embriões em não roedores | Procedimentos ortopédicos |
| Múltiplas injeções | Coleta de medula óssea | |
| Procedimento ocular não corneal | Procedimento ocular na córnea | |
| Implante de eletrodos intracerebrais | | |
| Vasectomia | | |
| Implantação de via de acesso vascular | | |
| Craniotomia (dor periosteal) | | |
| Linfadenectomia superficial | | |

Fonte: Adaptado de *National Institute Health*[36]

Uma das desvantagens de alguns agentes analgésicos é que necessitam ser administrados de forma injetável ou por gavagem, o que envolve excessiva manipulação do animal. Outra desvantagem é que muitos agentes, para manterem o efeito analgésico esperado, devem ser administrados com frequência em períodos curtos. O ideal seria utilizar um agente que possa ser administrado na água, para evitar o maior estresse do animal pela manipulação excessiva. Deve-se estar atento, contudo, que os animais no período pós-cirúrgico estarão com a ingestão de água reduzida, podendo o analgésico administrado na água não atingir o efeito desejado. Há também a possibilidade em adicionar ao protocolo de medicação pré-anestésica um agente analgésico de longa duração[18].

Os Quadros 11 e 12 apresentam princípios ativos e doses de medicamentos analgésicos indicados para ratos e camundongos de laboratório, a serem administrados sempre que houver a possibilidade de dor em razão do procedimento experimental. É importante ressaltar que não basta apenas administrar um analgésico; é necessário reavaliar o quadro do animal para confirmar se a dor foi controlada[33,36].

Quadro 11. Agentes analgésicos recomendados para ratos

| Categoria | Agente | Dosagem | Duração da analgesia | Indicação |
|---|---|---|---|---|
| Opioides | Buprenorfina | 0,02-0,5 mg/kg SC/IV/IP | 6-12 h | Dor moderada a severa |
| Opioides | Butorfanol | 0,2-2 mg/kg SC/IP | 2-4 h | Dor moderada a severa |
| Opioides | Meperidina | 10-20 mg/kg SC/IM | 2-3 h | Dor moderada a severa |
| Opioides | Morfina | 2-5 mg/kg SC | 2-4 h | Dor moderada a severa |
| AINES | Aspirina (ácido acetilsalicílico) | 100 mg/kg VO | 4-8 h | Dor leve a moderada |
| AINES | Flunixin meglumine | 1,1-2,5 mg/kg SC/IM | 12 h | Dor leve a moderada |
| AINES | Carprofeno | 1,5 mg/kg VO | 12 h | Dor leve a moderada |
| AINES | Ibuprofeno | 10-30 mg/kg VO | 4 h | Dor leve a moderada |
| AINES | Acetaminofeno (paracetamol) | 1-2 mg/mL na água | | Dor leve a moderada |
| AINES | Cetoprofeno | 5 mg/kg VO/IM | 24 h | Dor leve a moderada |

Fonte: Adaptado de Ness[34].
Legenda: IM – intramuscular; IP – intraperitoneal; SC – subcutânea; IV – intravenosa; VO – via oral.

Quadro 12. Agentes analgésicos recomendados para camundongos

| Categoria | Agente | Dosagem | Duração da analgesia | Indicação |
|---|---|---|---|---|
| Opioides | Buprenorfina | 0,05-2,5 mg/kg SC/IP | 6-12 h | Dor moderada a severa |
| Opioides | Butorfanol | 0,2-2 mg/kg SC/IP | 2-4 h | Dor moderada a severa |
| Opioides | Meperidina | 10-20 mg/kg SC/IM | 2-3 h | Dor moderada a severa |
| Opioides | Morfina | 2-5 mg/kg SC | 2-4 h | Dor moderada a severa |
| AINES | Aspirina (ácido acetilsalicílico) | 120 mg/kg VO | 4 h | Dor leve a moderada |
| AINES | Flunixin Meglumine | 0,3-2 mg/kg VO/IM/IV | 12-24 h | Dor leve a moderada |
| AINES | Carprofeno | 5 mg/kg SC | 24 h | Dor leve a moderada |
| AINES | Ibuprofeno | 7-15 mg/kg VO | 4 h | Dor leve a moderada |
| AINES | Acetaminofeno (paracetamol) | 1-2 mg/mL na água | | Dor leve a moderada |

Fonte: Adaptado de Ness[34].
Legenda: IM – intramuscular; IP – intraperitoneal; SC – subcutânea; IV – intravenosa; VO – via oral.

## EUTANÁSIA

O termo eutanásia é derivado do grego (*eu* = bom, *thanatos* = morte) e significa “boa morte”, ou seja, uma morte sem sofrimento. Uma “boa morte” é aquela em que o animal não sente dor nem angústia[53,54].

Na realização de experimentos científicos com animais, a eutanásia faz-se necessária no final do experimento ou nas seguintes ocorrências: ameaça ao bem-estar animal; impossibilidade de utilização de medicamentos para aliviar o distresse ou o sofrimento; ou, ainda, quando o animal constituir ameaça à saúde pública ou animal; ou for objeto de ensino[36,51]. Na maioria das vezes, a coleta de material biológico dos animais para análise ocorre antes ou após a eutanásia[35].

Como os pesquisadores são os responsáveis pela eutanásia do animal em

experimentação, é seu dever assegurar que estes sejam tratados em todos os momentos com o máximo de respeito, evitando que tenham uma morte dolorosa e que sejam tomados por angústia em momentos anteriores à morte, antes da perda de consciência.

As técnicas de eutanásia devem resultar em rápida perda de consciência, seguida por parada cardíaca ou respiratória e pela perda definitiva da função cerebral[32].

Além dos cuidados com o bem-estar do animal, devem-se levar em consideração os efeitos emocionais causados ao operador. As reações envolvem a dor pela perda de uma vida, mal-estar, distresse e desconforto. Devem ser buscadas soluções para amenizar esse problema, como rodízio de pessoal, treinamento dos pesquisadores e da equipe técnica quanto aos métodos humanitários de manejo e eutanásia e aos efeitos esperados do método utilizado, bem como quanto ao motivo pelo qual está sendo realizada a eutanásia. Se necessário, deve-se fazer acompanhamento psicológico dos envolvidos, pois a eutanásia de um animal pode fazer a pessoa entrar em conflito com seus princípios éticos e morais[35].

Independentemente das circunstâncias, o método de eutanásia sempre deve ser selecionado com base em princípios éticos e valores sociais e morais. Esse tema deve ser sempre revisto e estudado, a fim de buscar as melhores técnicas e equipamentos para realizar esse procedimento de forma eficiente e humanitária (Quadro 13).

A regulamentação dos procedimentos de eutanásia animal no Brasil se dá por meio da Resolução do CFMV nº 1.000, de 11 de maio de 2012[51]. Essa resolução determina como obrigatória a supervisão por médico veterinário dos procedimentos de eutanásia em todas as pesquisas que envolvam animais. Outra fonte sobre eutanásia é o *AVMA Guidelines on Euthanasia* (Disponível em: http://www.avma.org).

Quadro 13. Critérios para um método humanitário de eutanásia[35,52]

| |
|---|
| ✓ Ausência de sinais de medo, dor ou distresse |
| ✓ Período de tempo mínimo para que o animal fique inconsciente |
| ✓ O método deve ser confiável e passível de reprodução |
| ✓ O método deve ser seguro para o pessoal envolvido |
| ✓ Deve causar o mínimo de efeitos psicológicos e fisiológicos ao animal |
| ✓ Deve ser compatível com as necessidades da pesquisa |
| ✓ Não deve causar efeitos emocionais ao operador, ou causar o mínimo de efeitos |
| ✓ Deve trazer o mínimo de impacto sobre o meio ambiente |
| ✓ A manutenção dos equipamentos utilizados deve ser fácil e periódica |
| ✓ Deve ser realizado longe das salas de animais |
| ✓ O operador deve ser experiente na correta contenção e no manejo dos animais |

## Mecanismos para causar a morte

Os métodos de eutanásia produzem a morte por meio de três mecanismos[32]:

1. hipóxia direta ou indireta;
2. depressão direta de neurônios relacionados às funções vitais;
3. ruptura física da atividade cerebral.

## Seleção do método de eutanásia

Para que ocorra a morte humanitária, sem dor e distresse, o animal deverá perder a consciência antes de ocorrer a perda da atividade motora (muscular) [32].

Antes de realizar a eutanásia, deve-se procurar diminuir o distresse, o medo, a apreensão e a ansiedade do animal. Sempre manipulá-lo de forma gentil e calma e fora de seu alojamento. O Quadro 14 apresenta critérios a serem considerados na escolha do método de eutanásia.

Quadro 14. Critérios a serem considerados na escolha do método de eutanásia[32,51]

| |
|---|
| ✓ Espécie animal |
| ✓ Meios disponíveis para a contenção do animal |
| ✓ Habilidade da pessoa que vai realizar a eutanásia |
| ✓ Número de animais a serem submetidos a eutanásia |
| ✓ Tamanho dos animais a serem submetidos a eutanásia |

## Classificação dos métodos de eutanásia[32,35,51]

**Recomendados**: são aqueles que, quando utilizados isoladamente, produzem no animal uma morte humanitária (Quadro 15).

**Aceitos sob restrição**: são métodos que trazem o risco de não produzir a morte humanitária, pois ou apresentam probabilidade de erros cometidos pelo operador ou são técnicas de risco ocupacional. Esses métodos incluem também aqueles pouco descritos na literatura (Quadro 15).

**Inaceitáveis**: são os métodos que não produzem a morte humanitária sob nenhuma

circunstância. Entre eles estão também os métodos que envolvem um grande risco ocupacional para o operador (Quadro 16).

**Métodos adjuvantes**: produzem a morte humanitária quando em combinação com outras técnicas. Se utilizados isoladamente, são considerados inaceitáveis[32].

Quadro 15. Recomendação de agentes e métodos de eutanásia por espécie

| Espécie | Métodos aceitos | Métodos aceitos sob restrição |
|---|---|---|
| Coelhos | Barbitúricos, anestésicos gerais injetáveis, anestésicos inalatórios seguidos de outro procedimento para assegurar a morte, cloreto de potássio com anestesia geral prévia | $N_2$, argônio, deslocamento cervical (< 1 kg), T61, $CO_2$ |
| Ratos e camundongos | Barbitúricos, anestésicos gerais injetáveis, anestésicos inalatórios seguidos de outro procedimento para assegurar a morte, cloreto de potássio com anestesia geral prévia | $N_2$, argônio, deslocamento cervical (< 200 g), decapitação por guilhotina (<200 g), T61, $CO_2$ |

Fonte: Brasil[51].

Quadro 16. Métodos inaceitáveis de eutanásia

- ✓ Embolia gasosa
- ✓ Traumatismo craniano
- ✓ Incineração *in vivo*
- ✓ Hidrato de cloral (para pequenos animais)
- ✓ Clorofórmio ou éter sulfúrico
- ✓ Descompressão
- ✓ Afogamento
- ✓ Exsanguinação (sem sedação prévia)
- ✓ Imersão em formol ou qualquer outra substância fixadora
- ✓ Uso isolado de bloqueadores neuromusculares, sulfato de magnésio ou cloreto de potássio
- ✓ Qualquer substância tóxica que possa causar sofrimento e/ou demandar tempo excessivo para a morte
- ✓ Eletrocussão sem insensibilização ou anestesia prévia
- ✓ Qualquer outro método considerado sem embasamento científico

Fonte: Brasil[51].

## Métodos químicos

### Agentes inalantes

Em se tratando de agentes inalantes, há algumas considerações em comum a serem observadas, como descrito no Quadro 17. Os agentes inalantes utilizados para eutanásia incluem os gases anestésicos (halotano, enflurano, sevoflurano e isoflurano) e gases não anestésicos (dióxido de carbono, nitrogênio, argônio e monóxido de carbono). Em ambos os casos, a eutanásia se dá com a administração excessiva do gás escolhido[32,52]. Quanto à sua utilização, cada agente apresenta vantagens e desvantagens. Os agentes clorofórmio e o éter não são mais aceitos como métodos de eutanásia, por causa não somente de seus riscos potenciais carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos, no caso do clorofórmio, de efeitos cumulativos para o funcionário, mas também por suas características inflamáveis e explosivas, como é o caso do éter[35].

No Biotério, é utilizado como método químico com agente inalante o gás dióxido de carbono, ou $CO_2$ (Anexo 6). A inalação de uma concentração de $CO_2$ a 7,5% aumenta o limiar de dor, e as concentrações maiores têm efeito anestésico[32]. A eutanásia em câmara de $CO_2$ é um procedimento de eutanásia aceito sob restrição em ratos e camundongos[51]. É o método de eutanásia mais comum realizado pelo *National Institutes of Health* (NIH) em camundongos, ratos, cobaias e hamsters[50].

Quadro 17. Critérios quanto ao uso de agentes inalantes para eutanásia

- ✓ Realizar a manutenção dos equipamentos utilizados para eutanásia regularmente[32] (a qualidade e a eficiência dos equipamentos são fundamentais)
- ✓ Realizar controle dos agentes, pois a maioria é considerada perigosa por trazer risco de explosões, narcose, hipóxia, dependência química e efeitos adversos à saúde pela exposição crônica[32]
- ✓ Animais com problemas respiratórios demoram a atingir uma concentração alveolar suficiente para a eutanásia, devendo-se, nesses casos, utilizar um método não inalatório[32]
- ✓ Neonatos são mais resistentes à hipóxia do que adultos, demorando mais para morrer. É recomendado, portanto, não utilizar agentes inalatórios como método único de eutanásia[32,53]
- ✓ Quando for utilizada câmara de gás, os animais a serem colocados nesta para serem submetidos a eutanásia devem ser da mesma espécie. Deve-se cuidar para não colocar muitos animais de uma vez só e manter a câmara sempre limpa, para evitar odores estressantes[32]
- ✓ É importante constatar-se de que o animal está mesmo morto antes de retirá-lo da câmara[32,50]

## Eutanásia em câmara de $CO_2$

O gás utilizado é o comprimido em cilindro em razão da possibilidade de regulagem do afluxo de gás para dentro da câmara[32,50] (Figura 29). Outras fontes que não sejam o ar comprimido no cilindro não são aceitas[32].

Com a câmara contendo uma concentração de 70% de $CO_2$ e 30% de $O_2$ produz-se rápida depressão do Sistema Nervoso Central, porém a exposição súbita de animais conscientes a concentrações de $CO_2$ em nível igual ou superior a 70% causa distresse[50]. O correto é adequar a velocidade de enchimento da câmara com $CO_2$ em uma vazão de 20% do volume da câmara por minuto, adicionado ao ar já existente. Dessa forma é possível obter um equilíbrio adequado de mistura de gás para obter a inconsciência rápida dos animais com o mínimo de sofrimento[32,50].

O $CO_2$ é um gás de baixo custo, não inflamável e não explosivo, oferecendo baixo risco ocupacional se utilizado com equipamentos apropriados e com manutenção periódica para evitar riscos de vazamento[32].

O fluxo de gás deve ser mantido por aproximadamente 1 minuto após constatada a morte aparente[32] ou até que a morte clínica seja assegurada[50].

Figura 29. Câmara de $CO_2$

### Agentes não inalantes

A utilização de agentes farmacêuticos injetáveis é a maneira mais confiável e rápida para a realização da eutanásia[32]. A maioria dos agentes anestésicos injetáveis é aceita para a eutanásia por overdose (administração do dobro ou triplo da dose anestésica recomendada)[35,52]. Entre eles os barbitúricos são os mais utilizados, levando primeiro a uma depressão do sistema respiratório e depois a parada cardíaca, que ocorre quando se atinge um plano profundo de anestesia[35,55].

Se a espécie animal dificulta o acesso venoso para a administração do agente, pode ser utilizada a via intraperitoneal, porém com a utilização de substância não irritante e que não tenha ação de bloqueio neuromuscular[32].

Na administração do agente por via intraperitoneal, pode demorar para que o animal alcance os planos mais profundos de anestesia, assim, deve-se colocá-lo dentro de uma caixa limpa e em ambiente calmo e silencioso, para minimizar excitação e traumas[32].

## Métodos físicos

Os métodos físicos de eutanásia aceitáveis sob restrição em roedores são o de deslocamento cervical (ratos com menos de 200 g) e o de decapitação por meio de guilhotina[51]. Comparados a outros métodos de eutanásia, são bastante eficientes, porém esteticamente desagradáveis[35,53]. No entanto, deverão ser praticados por técnicos altamente capacitados e treinados e com equipamentos adequados, para que o procedimento seja rápido e humanitário[53,55]. Em geral, os métodos físicos de eutanásia são utilizados quando a realização do método químico interferir de alguma forma nos dados da pesquisa[35,52,53].

### Deslocamento cervical

Nessa técnica a morte do animal ocorre ao se aplicar pressão na base do seu crânio, deslocando-lhe a coluna e separando o crânio da medula espinhal[35,52,55]. Aparentemente, se praticado por pessoa treinada e com habilidade, é um método humanitário. No entanto, há poucas referências na literatura que sustentem essa afirmação[32].

### Decapitação por guilhotina

Esse método permite obter amostras sem alteração anatômica de cérebro e tecidos.

além de fluidos e tecidos não contaminados quimicamente[32,35,52]. Essa técnica, que pode ser utilizada na eutanásia de roedores e coelhos pequenos[32,55], consiste na utilização de uma guilhotina especial para eutanásia. Nesse método, secciona-se o pescoço do animal por instrumento cortante[35,53]. No entanto, é necessária a prévia adaptação dos animais (mínimo uma semana) aos equipamentos que serão utilizados no procedimento bem como o treinamento do operador. Além disso, a utilização desse método deve ser muito bem justificada no protocolo experimental.

## Eutanásia de fetos e neonatos

Para avaliar qual o melhor método de eutanásia, deve-se identificar a idade do feto ou neonato e verificar se os animais serão necessários ao estudo[49] (Quadro 18).

Os animais neonatos são relativamente resistentes à hipóxia; por isso, antes de levá-los à eutanásia, é preciso considerar esse fator, já que os agentes inalantes como o $CO_2$ demoram mais para produzir inconsciência nos neonatos do que nos animais adultos[32,35]. Deve-se confirmar a eutanásia com um método secundário físico[49].

No caso dos fetos até o 15º dia de gestação, ainda não há percepção da dor. A partir do 15º dia da gestação até o nascimento, porém, ocorre o desenvolvimento neural, havendo a probabilidade de os sinais de dor serem processados bioquímica e neurofisiologicamente[49]. No entanto, evidências recentes implicam que os fetos nessa fase não são sensíveis nem conscientes, sendo, portanto, incapazes de perceber a dor de fato[32].

Nessa fase, se os fetos não são necessários para o estudo, a eutanásia da mãe deve assegurar a rápida anóxia cerebral dos fetos. O método recomendado de eutanásia da mãe é o de exposição ao $CO_2$, seguido de deslocamento cervical, decapitação ou pneumotórax bilateral. Se os fetos são necessários ao estudo, no caso de fixação de tecidos e eutanásia por congelamento, o feto deve ser previamente anestesiado[49].

Para mais informações a respeito de eutanásia de fetos e neonatos, consultar *Guidelines for the Euthanasia of Rodent Feti and Neonates.* Disponível em: http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Rodent_Euthanasia_Pup.pdf.

Quadro 18. Recomendações de eutanásia para fetos e neonatos de ratos e camundongos

| | |
|---|---|
| **Fetos** | |
| Até 15 dias de idade | O animal ainda está no útero e, portanto, ainda não respirou. Nessa fase, como não têm percepção da dor, a eutanásia da mãe, privando-os de aporte sanguíneo, assegura a eutanásia |
| 15 dias até o nascimento | Se os animais forem expostos ao ambiente extrauterino e, portanto, respirarem, a eutanásia deve ser por método físico, como a decapitação com tesoura cirúrgica. Caso o útero e os sacos amnióticos estejam intactos, significa que o animal não respirou. Assim, a simples retirada do útero ocasiona a parada brusca de oxigenação sanguínea para os fetos, resultando em sua morte |
| **Neonatos** | |
| Até 10 dias de idade | Injeção de anestésicos químicos e métodos físicos são aceitáveis. Nessa fase, são sensíveis aos anestésicos inalatórios, embora a exposição prolongada possa ser necessária, sendo recomendado um método secundário físico para garantir a morte. Se necessária a imersão em nitrogênio líquido ou um método de fixação/perfusão, o animal deverá ser anestesiado previamente |
| Mais de 10 dias de idade | Seguir as recomendações de eutanásia para animais adultos da mesma espécie |

Fonte: Adaptado de *National Institute of Health*[49].

## Constatação da cessação dos sinais vitais

É muito importante que o responsável pela eutanásia verifique se o animal está realmente morto, principalmente antes de descartar sua carcaça.

Por exemplo, pode ocorrer de o animal estar em profunda narcose e, ao ser interrompida a administração do agente inalatório de eutanásia (por exemplo, em uma eutanásia em câmara de $CO_2$), eventualmente recuperar-se[32].

Por isso, deve-se treinar o operador para fazer a constatação da ausência dos sinais vitais no animal: avaliar se houve cessação dos batimentos cardíacos, se não há reflexo ao toque do globo ocular e se as mucosas estão arroxeadas, indicando anóxia[35,53], entre outros.

## REFERÊNCIAS


1. Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Instrução Normativa n°7, Normas para o trabalho em contenção com organismos geneticamente modificados-OGMs. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 9 jun. 1997, seção 3, p. 11833.
2. Marques N, Menna-Barreto L. Cronobiologia: princípios e aplicações. 3a ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 1999. 448p.
3. Clough G. The animal house: design, equipment and environmental control. In: Poole T. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 7th ed. British: Blackwell Science; 2006. v.1, p.97-136.
4. Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 1 de 1988, art. 64. Disponível em: http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_88.htm.
5. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 7th ed. Washington: The National Academies Press; 2010.
6. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 358 de 2005 [citado 24 set. 2012]. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35805.pdf.
7. Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA). Felasa recommendations for the education and training of persons working with laboratory animals: categories A and C. Lab Anim. 1995:29:121-31.
8. Brasil. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Resolução Normativa nº 2, de 27 de novembro de 2006. Disponível em: http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3913.html.
9. Torrallardona AV. Armonización y estandarización. Buenas prácticas de laboratório (BPL). In: Zùñiga JM, Marí JAT, Milocco SN, Piñeiro R. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Madrid: Mcgraw - Hill Interamericana; 2001. p.629-42.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Critérios para a habilitação de laboratórios segundo os princípios das boas práticas de laboratório (BPL). Brasília; 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/reblas/procedimentos/GGLAS_02_bpl.pdf.
11. Brasil. Decreto nº 5.591 de 22 de novembro de 2005. Disponível em: https://legislacao.planalto.gov.br/LEGISLA/Legislacao.nsf.
12. Neves SMP, Chaguri LCAG, Fontes RSF, Ong FMP. Biossegurança em biotérios. In: Hirata MH, Hirata RDC, Mancini, Filho JM. Manual de biossegurança. 2a ed. Barueri: Manole; 2012. p.193-211.
13. Brasil. Ministério do Trabalho. Portaria nº 25 (NR-6). Disponível em: http://portal.mte.gov.br/legislacao/portaria-n-25-de-15-10-2001.htm.
14. Molinaro EM, Majerowicz J, Valle S. Biossegurança em biotérios. Rio de Janeiro: Interciência; 2007. 236p.

15. Botahm PA, Davies GE, Teasdale EL. Allergy to laboratory animals: a prospective study of its incidence and of the influence of atopy on its development. Brit J Ind Med.1987;44:627-32.

16. Carissimi, AS, Chaguri LACG, Teixeira MA, Mori CMC, Macchione, M, Anna ETYGS, Saldiva, PHN, Souza, NL, Merusse JB. Effects of two ventilation systems and bedding change frequency on cage environmental factors in rats (Rattus norvegicus). Animal Technol. 2000;51(3):161.

17. Andersen ML, D´Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF. Procedimentos experimentais. In: Andersen ML, D´Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo; 2004. p. 45-70.

18. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington: The National Academies Press; 2011. 248p. Disponível em: http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf.

19. Diehl HR, Morton D, Pfister R, Rabemampianema Y, Smith D, Vidal JM, Van de Vorstenbosch CA. A Good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routs and volumes. J Appl Toxical. 2001;21:15-23.

20. National Institute of Health. Disponível em: http://bioethics.od.nih.gov/animals.html.

21. Jackson LR, Fox JG. Institutional policies and guidelines on adjuvants and antibody production. ILAR J. 1995;37(3):141-50.

22. Canadian Council on Animal Care in Science. CCAC Guide to the care and use of experimental animals. 2nd ed. Canadá; 1993. v.1.

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

24. Santos BF. Criação e manejo de camundongos. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2002. p.115-8.

25. National Research Council. Guia para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Bethesda, U.S.: Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health; 1985. (NIH Publication, nº 90-23S).

26. Bogdanske JJ, Stelle SH, Riley MR, Schiffman BM. Laboratory rat: procedural techiniques. USA: Crs Press; 2011. 80p.

27. Lapchik VBV, Mattaraia VGM. Técnicas de coleta de fluidos e vias de administração. In: Feijó AGS, Braga LMGM, Pitrez PMC. Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos. Porto Alegre: EdiPUCRS; 2010. p.191-7.

28. Bogdanske JJ, Stelle SH, Riley MR, Schiffman BM. Laboratory mouse: procedural techiniques. USA: Crs Press; 2011. 80p.

29. Flecknell P. Laboratory animal anaesthesia. 3rd ed. United Kingdon: Academic Press; 2009. 300 p.

30. Lapchik VBV. Vias de Administração e coleta de fluidos. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 575-92.

31. FELASA. Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit breeding colonies. 1999.

32. American Veterinary Medical Association (AVMA). Report of the AVMA Panel on euthanasia. JAVMA. 2007;218(5).

33. Rivera EAB. Analgesia em animais de experimentação. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2002. p. 247-53.

34. Ness RD. Rodents. In: Carpenter JW. Exotic animal formulary. 3rd ed. United States of America: Elsevier Saunders; 2005. p. 377-408.

35. Rivera EAB. Analgesia, anestesia e eutanásia em roedores, lagomorfos, cães e suínos. In: Feijó AGS, Braga LMGM, Pitrez PMC. Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos. Porto Alegre: EdiPUCRS; 2010. p. 198-216.

36. National Institute of Health (NIH). Guidelines for Pain and Distress in Laboratory Animals: Responsibilities, Recognition and Alleviation. Issuing Office: OACU; 2010. Available from: http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Pain_and_distress.pdf.

37. University of South Florida. Division of Comparative Medicine. Guidelines on anesthesia and analgesia in laboratory animals. Available from: http://www3.research.usf.edu/cm/references.asp

38. Andersen ML, Souza MC. Estresse e suas interferências. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 517-36.

39. Medrazi TJ; Tomáz VA; Amaral VLL. Anestesia e analgesia em animais de laboratório. In: Medrazi TJ; Tomáz VA; Amaral VLL. Animais de laboratório: Cuidados na iniciação experimental. Florianópolis: Editora da UFSC; 2004. p. 101-30.

40. Pritchett-Corning KR, Mulder GB, Luo Y, White WJ. Principles of rodent surgery for the new surgeon. J Vis Exp. 2011;(47):e2586. DOI: 10.3791/2586.

41. Sharp PE, La Regina MC. Veterinary care. The laboratory rat. Florida: Crc Press LLC; 1998. p. 75-137.

42. Suckow MA, Danneman P, Brayton C. Veterinary care. The laboratory mouse. Florida: Crc Press LLC; 2011. p. 51-120.

43. Koolhaas JM. The laboratory rat. In: Poole T. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 7th ed. British: Blackwell Science; 2006. v.1, p. 313-30.

44. Rivera EAB. Anestesia em animais de laboratório. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 255-62.

45. Hickman DL, Swan M. Use of a body condition score technique to assess health status in a rat model of polycystic kidney disease. J Am Assoc Lab Animal Sci, Indiana. 2010;49(2):155-9 [cited 2010 May 1]. Available from: http://aalas.publisher.ingentaconnect.com/content/aalas/jaalas/2010/00000049/00000002.

46. Ullman-Culleré MH, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. Lab Animal Sci, Massachusetts. 1999;49(3):319-23.

47. Rivera EAB. Estresse em animais de laboratório. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2002. p. 263-273.

48. Pompeu E. Analgesia e anestesia. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 561-74.

49. National Institute of Health (NIH). Guidelines for the euthanasia of rodent feti and neonates. Issuing Office: OACU, 2011. Available from http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Rodent_Euthanasia_Pup.pdf

50. National Institute of Health (NIH). Guidelines for euthanasia of rodents using carbon dioxide. Issuing Office: OACU, 2010. Available from: http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Rodent_Euthanasia_Adult.pdf.

51. Brasil. Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Resolução nº 1000. Brasília, 11 de maio de 2012. Disponível em: http://www.cfmv.org.br.

52. Andersen ML, D´Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF. Eutanásia. In: Andersen ML, D´Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo; 2004. p. 71-9.

53. Lapchik VBV, Mattaraia VGM. Finalização humanitária. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 603-15.

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

55. Drazi TJ, Tomáz VA, Amaral VLL. Eutanásia animal. In: Medrazi TJ, Tomáz VA, Amaral VLL. Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental. Florianópolis: Editora da UFSC; 2004. P. 131-139.

Capítulo 7

# Controle Nutricional

**Silvânia M. P. Neves**

**Flavia M. P. Ong**

**Renata Spalutto Fontes**

Introdução

Avaliação nutricional das rações comerciais

Escolha da ração comercial

Referências

## INTRODUÇÃO

O estado nutricional do animal de laboratório influencia sua capacidade para atingir seu potencial genético de crescimento, de longevidade, de reprodução, bem como sua resposta a patógenos e a outros tipos de estresse ambiental. Uma dieta balanceada, de formulação conhecida e reprodutível, garante não só o bem-estar dos animais, mas também a qualidade dos resultados dos experimentos conduzidos com esses animais[1].

A dieta de animais de laboratório deve ter cerca de 50 nutrientes em concentração adequada, que atendam às necessidades nutricionais do animal, além de ser livre de substâncias tóxicas ou microrganismos patogênicos[2].

As formulações das dietas são classificadas de acordo com o grau de refinamento de seus ingredientes, em dietas quimicamente definidas ou puras, dietas purificadas e dietas com ingredientes naturais (ração comercial)[1,2].

A dieta quimicamente definida é formulada diretamente à base de nutrientes essenciais, como aminoácidos, ésteres de ácidos graxos, glicose, vitaminas e sais minerais. Na seleção

de ingredientes, devem-se considerar fatores como estabilidade química e solubilidade (em dieta líquida), e todos os nutrientes essenciais são adicionados individualmente.

Essa dieta é isenta de contaminantes químicos e de fatores estimuladores de enzimas, embora seja mais cara e tornar-se instável à temperatura ambiente. Esse tipo de dieta é utilizado basicamente em estudos experimentais.

A referência para dieta de animais de laboratório é o *American Institute of Nutrition (*AIN-93)[3], que propõe uma formulação para as fases de crescimento, gestação e lactação dos animais (AIN-93G) e para a fase de manutenção de animais adultos (AIN-93M). Esse tipo de especificação foi definido para padronizar os estudos nutricionais em roedores, reduzir a variação inerente às dietas à base de cereais ou de ingredientes naturais e facilitar a interpretação e a comparação de resultados.

As dietas purificadas são formuladas com uma combinação de ingredientes puros e invariáveis, minimizando, assim, a variabilidade encontrada em dietas comerciais, que utilizam ingredientes naturais. Como exemplos de ingredientes purificados, podemos citar a caseína e a proteína isolada de soja (fonte de proteína). Entretanto, até mesmo esses ingredientes podem conter quantidades variáveis de nutrientes essenciais, e as dietas experimentais destinadas a produzir deficiências específicas precisam ser mais restritivas quanto às especificações de seus ingredientes[2].

As rações comerciais para animais de laboratório são as mais comumente utilizadas tanto nos biotérios de produção como nos de experimentação. No entanto, a grande variação em sua composição pode produzir alterações nas concentrações de seus nutrientes[4], especialmente os micronutrientes, fazendo com que não haja dois lotes idênticos.

Esse tipo de ração também pode contaminar-se com resíduos de pesticidas, metais pesados ou outros agentes que comprometem os resultados experimentais.

A dieta composta de ingredientes naturais pode apresentar menor biodisponibilidade, em razão da forma química dos nutrientes que a compõem, das interações com outros componentes (como fitatos e fibras) e do processamento a que é submetida.

No Brasil, os fabricantes de rações comerciais para roedores não consideram as diferenças nutricionais necessárias para as diferentes fases de vida dos animais de laboratórios, como recomendado pelo *American Institute of Nutrition (AIN-93)*[3] e pelo *National Research Council*[1]; portanto, essas rações devem ser submetidas a controles químicos e biológicos periódicos.

## AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DAS RAÇÕES COMERCIAIS

Há grande variação na composição das rações comerciais disponíveis no mercado,

o que afeta a qualidade dos experimentos. Dessa forma, o Biotério, em conjunto com o Laboratório de Nutrição e Minerais da FCF-USP, realiza a avaliação nutricional das rações comerciais utilizadas, com o objetivo de definir o padrão de identidade e qualidade, por meio de estudos comparativos das diferentes marcas de rações comerciais (A, B e C), disponíveis para ratos e camundongos, utilizando como controle uma dieta à base de caseína (P). São realizadas análises de composição centesimal (Tabela 1), minerais (Tabela 2) e de vitaminas, estas últimas feitas no Instituto Adolfo Lutz e no Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital) (Tabela 3). Os ensaios biológicos envolvem a avaliação da qualidade da proteína *in vivo*, pela determinação do coeficiente de digestibilidade (Tabela 4), que indica a proporção de alimento ingerido que é digerido e absorvido pelo organismo do animal.

**Tabela 1**. Análise da composição centesimal (%) de rações comerciais para ratos e camundongos de diferentes marcas existentes no mercado nacional

| Ração | Umidade | Proteínas | Lipídios | Fibras |
|---|---|---|---|---|
| A | 11±1,05 | 19±0,50 | 4±0,13 | 19 |
| B | 12±0,35 | 22±0,57 | 4±0,17 | 20 |
| C | 11±0,99 | 22±0,82 | 4±0,23 | 32 |
| P(*) | 12±0,04 | 19±0,5 | 7±0,1 | 5 |
| AIN 93G(ref.) | | 19,3 | 7 | 5 |
| NRC (ref.) | | 20 | 5 | 5 |

(*) Dieta-padrão AIN 93G.

**Tabela 2**. Análise da composição de minerais (mg/kg) de rações comerciais para ratos e camundongos de diferentes marcas existentes no mercado nacional

| Ração | Fe | Zn | Cu |
|---|---|---|---|
| A | 1013±35 | 154 ±8 | 26±0,86 |
| B | 989±31 | 99±1,2 | 35±1,00 |
| C | 928±18 | 103 ±2,1 | 19±0,78 |
| P(*) | 45±0,3 | 38±0,4 | 6,0±0,9 |
| AIN 93G(ref.) | 35 | 30 | 6 |
| NRC (ref.) | 35 | 30 | 6 |

(*) Dieta-padrão AIN 93G.

**Tabela 3**. Análise de vitaminas de rações comerciais para ratos e camundongos, esterilizadas pelos processos de calor úmido (autoclave) e irradiação gama

| Ração | A | E | $B_1$ | $B_2$ | $B_3$ | $B_{12}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | (UI/kg) | (UI/kg) | (mg/kg) | (mg/kg) | (mg/kg) | (µg/kg) |
| A | 949 | 153 | 5,9 | 13,5 | 33 | 66 |
| A1 | 1.030 | 213 | 3,6 | 15,2 | 44 | 60 |
| B | 2.333 | 255 | 7,2 | 15,2 | 33 | 79 |
| P(*) | 4.000 | 75 | 5,0 | 6,0 | 30 | 25 |

A e B – Ração comercial irradiada com 12 kGy de radiação gama.
A1 – Ração comercial autoclavável e esterilizada pelo processo de calor úmido (autoclave), 121 °C/ 15 min.
(*) Dieta-padrão AIN 93G.

**Tabela 4**. Avaliação nutricional de diferentes marcas de rações comerciais para ratos e camundongos

| Ração | N | Proteínas (%) | Coeficiente de digestibilidade (%) |
|---|---|---|---|
| A | 6 | 23±0,61 | 80±1,7 |
| B | 6 | 23±0,57 | 75±2,8 |
| C | 6 | 21±1,20 | 72±1,1 |
| P(*) | 6 | 24±0,5 | 95±0,3 |

(*) Dieta-padrão AIN 93G.

Os resultados mostraram que as rações apresentavam composição semelhante em proteína (21-24%), umidade (9-11%) e lipídeos (4-7%). No entanto, o coeficiente de digestibilidade variou de 70% a 80% nas dietas comerciais, enquanto na dieta-padrão foi de 95%. Além disso, a composição em minerais variou muito, e, no caso do ferro, sua concentração, em uma das dietas comerciais, chegou a ser 20 vezes maior do que a da dieta-padrão. Essa variação na composição dos nutrientes cria ambientes nutricionais diferentes cujas consequências experimentais muitas vezes não são consideradas pelo pesquisador que não é da área de nutrição.

Atualmente, a ração oferecida para os roedores no Biotério é peletizada, balanceada e descontaminada por irradiação, na dose de 12-15 kGy[5]. Essa dose esterilizante é estabelecida de acordo com o grau de contaminação inicial das amostras e, dependendo da dose, pode haver uma alteração da palatabilidade dessas rações, resultante da oxidação lipídica. Assim sendo, foram avaliados o grau de contaminação e o coeficiente de eficácia alimentar (CEA = ganho de peso(g)/consumo(g)) de rações comerciais irradiadas em três níveis de doses: grupo controle (não irradiado) e três grupos irradiados nas doses de 5 kGy, 10 kGy e 15 kGy[5].

Observou-se que não houve diferenças significativas entre os três tratamentos quanto ao consumo e à qualidade nutricional da ração avaliada por esse índice. Já na análise microbiológica dessa ração irradiada, constatou-se que, para as doses de 10 kGy e 15 kGy, não houve crescimento de colônia de microrganismos do produto analisado[5].

Os resultados apresentados neste capítulo têm-se mantido nas análises realizadas.

## Escolha da ração comercial

Nos últimos anos, várias empresas fornecedoras de rações comerciais saíram do mercado nacional, permanecendo poucas, o que diminui as opções para a escolha da dieta de melhor qualidade.

Um dos pré-requisitos definidos para a compra de ração para o Biotério é que a ração seja peletizada e balanceada, composta de milho integral moído, farelo de trigo, farelo de soja, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, aminoácido e premix mineral e vitamínico. Deve apresentar-se íntegra e manter suas características organolépticas (odor, sabor, cor e consistência). Os níveis de garantia por quilograma do produto estão listados na Tabela 5.

**Tabela 5**. Níveis de garantia do produto

| Componente | Quantidade (expresso/kg produto) |
|---|---|
| Proteína bruta | 20% (mín.) a 23% (máx.) |
| Lipídios (extrato etéreo) | 4% (mín.) a 5% (máx.) |
| Fibra total (matéria fibrosa) | 5% (mín.) a 8% (máx.) |
| Umidade | Máxima 12,5% |
| Ferro | 50 mg/kg (mín.) a 300 mg/kg (máx.) |
| Zinco | 30 mg/kg (mín.) a 130 mg/kg (máx.) |
| Cobre | 6 mg/kg (mín.) a 20 mg/kg (máx.) |
| Cálcio | Máximo entre 1,3% e 1,4% |
| Fósforo | Mínimo entre 0,5% e 0,8% |
| Vitamina A | Mínimo de 12.000 UI/kg |
| Aditivos | Antioxidantes 100,00 mg |

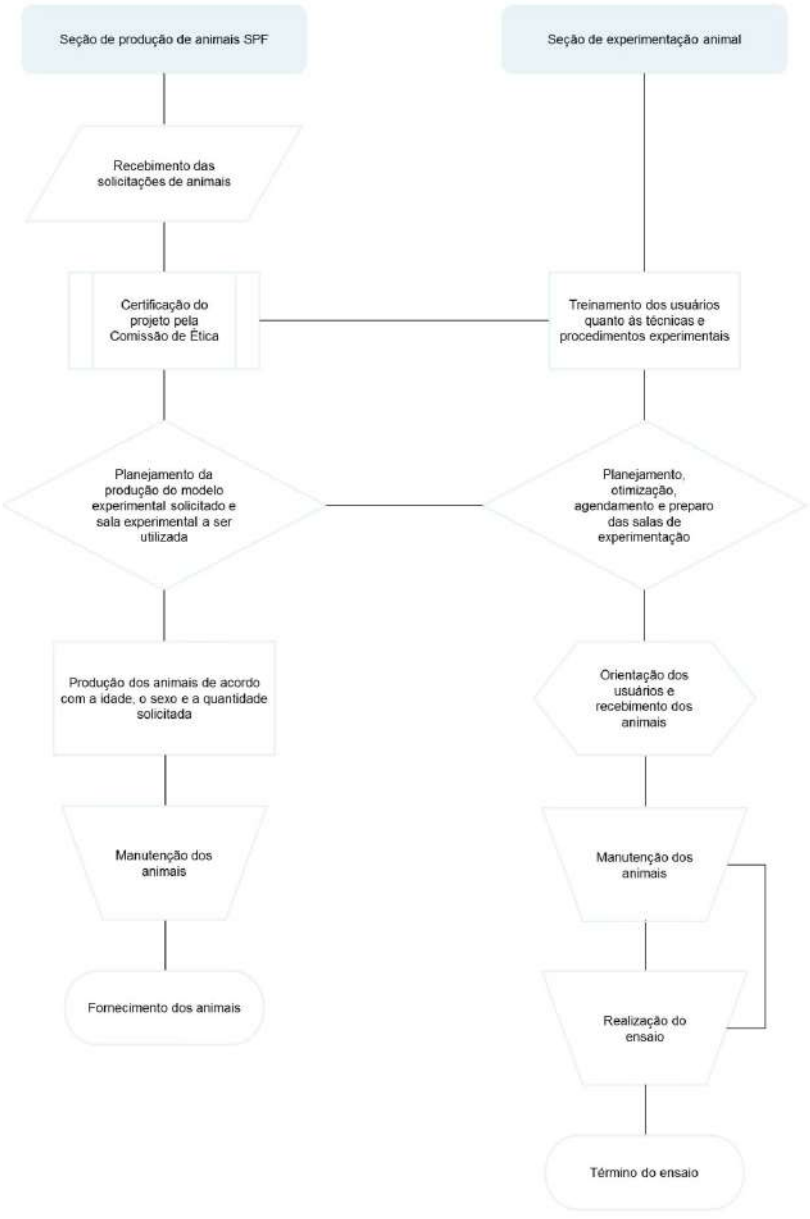
Dessa forma, conclui-se que o mercado não oferece rações comerciais de formulações variadas que atendam às diferentes fases de vida dos animais, o que seria muito importante. Além disso, se houvesse uma redução da variabilidade na composição dessas rações, especialmente de micronutrientes, seguramente diminuiriam também os desvios na reprodutibilidade de diferentes ensaios feitos com animais alimentados com essas dietas.

## REFERÊNCIAS


1. NRC. National Research Council. Board on Agriculture. Committee on Animal Nutrition. Subcommittee on Laboratory Animals. Nutriente requeriments of laboratory animals. 4th ed. rev. 1995.
2. Coates ME, editor. ICLAS guidelines on the selection and formulation of diets for animals in biomedical research. London: Institute of Biology; 1987.
3. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN – 93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN – 76A rodent diet. J Nutr. 1993;123:1939-51.
4. Knapka JJ. Nutrition. In: Foster HL, Small JD, Fox JG, editors. The biomedical reserch. New York: Academic Press; 1983. v.3, p.51-67.
5. Neves SP, Damy SB, Coli C, Tolosa EMC. Esterilização de ração para animais de laboratório por irradiação gama. Controle de Contaminação. 2005; fev. 36-8.

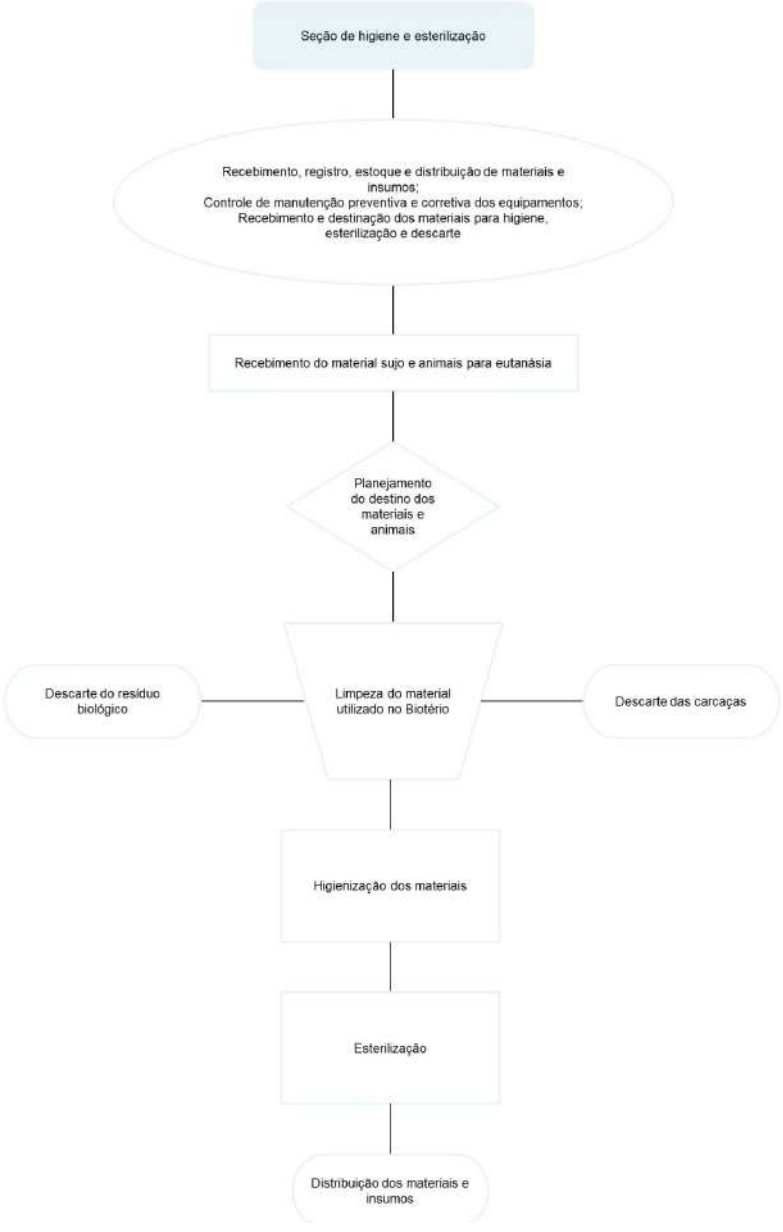
# Anexos

## Anexo 1. Fluxograma: Seções de produção e experimentação




| Símbolo | Significado | Símbolo | Significado | Símbolo | Significado |
|---|---|---|---|---|---|
| | Processo; Execução de operações | | Ponto de decisão | | Entrada e saída de dados |
| | Limites: Início e fim | | Operação manual | | Operação |

## Anexo 2. Fluxograma: Seção de higiene e esterilização




| Símbolo | Significado | Símbolo | Significado | Símbolo | Significado |
|---|---|---|---|---|---|
| | Processo; Execução de operações | | Ponto de decisão | | Entrada e saída de dados |
| | Limites: Início e fim | | Operação manual | | Operação |

## Anexo 3. Procedimento Operacional Padronizado (POP)

Título: Procedimento para operação da máquina de lavar gaiolas
Número: FCF-IQ/USP/POP/BPE/1 Seção: 1.1
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Esse POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas por todos os funcionários envolvidos em atividades de rotina executadas na seção de higienização e esterilização do Biotério de Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se à operação da máquina de lavar gaiolas, presente na seção de higienização e esterilização do BPE FCF-IQ/USP.

Siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

1 – Seção de higiene e esterilização

1.1 Procedimento para operação da máquina de lavar gaiolas:

1.1.1 Procedimento para ligar a máquina:

1. Girar a chave na posição **liga** no painel;
2. Observar o dosador de detergente;
3. Aguardar cerca de 15 minutos para que o reservatório de água seja preenchido e a máquina aqueça a água a 80 °C;
4. Após esse processo, a máquina está pronta para ser utilizada.

1.1.2 Procedimento para operar a máquina:

1. Apertar o botão verde (**opera**) no painel;

2. Colocar as gaiolas na extremidade inicial da máquina, uma a uma, e aguardar cerca de 1 minuto para que atravessem toda a extensão da máquina;
3. Retirar na extremidade final da máquina, as gaiolas higienizadas, organizando-as em pilhas para serem posteriormente autoclavadas.

1.1.3 Procedimento para desligar a máquina:

1. Apertar o botão vermelho (**parada**) no painel;
2. Girar a chave na posição **desliga** no painel.

1.1.4 Procedimento para limpeza da máquina:

1. Com a máquina desligada, retirar a tampa lateral;
2. Retirar o cilindro de vedação dentro do reservatório e esperar a água escoar;
3. Retirar as bandejas e o filtro, lavando com esponja e detergente e eliminando restos de resíduos destes;
4. Retirar os resíduos retidos no interior do reservatório de água;
5. Lavar o reservatório com água e detergente;
6. Enxaguar o reservatório com água;
7. Recolocar o filtro, o cilindro de vedação e as bandejas;
8. Recolocar a tampa lateral.

## Anexo 4. Procedimento Operacional Padronizado (POP)

Título: Procedimento para operação das autoclaves
Número: FCF-IQ/USP/POP/BPE/1 Seção: 1.2 a 1.3
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Esse POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas por todos os funcionários envolvidos em atividades de rotina executadas na seção de higiene e esterilização do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se à operação das autoclaves, presentes na seção de higiene e esterilização do BPE FCF-IQ/USP.

Siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

1 – Seção de higiene e esterilização

1.2 Procedimentos para operação das autoclaves 1 e 2:

1.2.1 Procedimentos para ligar a máquina:

1. Ligar os dois compressores posicionando as chaves vermelhas para baixo.
2. Ligar o sistema de osmose reversa apertando os dois botões vermelhos para cima;
3. Girar, no painel da autoclave, a chave geral na posição I, ligando a autoclave;
4. Aguardar a inicialização da máquina observando no visor;
5. Observar os manômetros do sistema de osmose reversa e da autoclave.

1.2.2 Procedimentos para realizar o ciclo de esterilização:

1. No visor, selecionar a opção login e preencher as opções *user* (BIOTERIO) e

*password* (*****);

2. No visor, selecionar a função menu;
3. Selecionar a função partida;
4. Selecionar no visor o ciclo a ser realizado (ÁGUA, TAMPA, CAIXAS ou MARAVALHA) e confirmar selecionando a seta verde para a direita;
5. Conferir no visor os parâmetros do ciclo selecionado e pressionar OK;
6. Selecionar a seta verde para a direita;
7. Selecionar a opção OK;
8. Aguardar a execução do ciclo de esterilização.

1.2.3 Procedimentos para desligar a máquina:

1. Após a finalização do ciclo, pressionar no visor a opção OK;
2. Aguardar aproximadamente 15 segundos para o destravamento da porta;
3. Girar, no painel da autoclave, a chave geral na posição 0, desligando a autoclave;
4. No fim do expediente, após o último ciclo de esterilização, arquivar no caderno de registro de esterilização os registros impressos dos ciclos realizados;
5. Desligar o sistema de osmose reversa apertando os dois botões vermelhos para baixo;
6. Desligar os dois compressores posicionando as chaves vermelhas para cima.

1.3 Procedimento para operação das autoclaves 3 e 4:

1.3.1 Procedimento para ligar a máquina:

1. Posicionar o botão vermelho de liga/desliga para cima;
2. Observar os manômetros para verificar a pressão.

1.3.2 Procedimento para realizar o ciclo de esterilização:

1. Selecionar o ciclo no painel de acordo com a tabela:

| | |
|---|---|
| F1 + 1 | Maravalha e roupas |
| F1 + 2 | Caixas, roupas |
| F1 + 3 | Água, luvas |
| F1 + 4 | Tampas |

1.3.3- Procedimento para desligar a máquina:

1. Posicionar o botão vermelho de liga/desliga para baixo.

## Anexo 5. Procedimento Operacional Padronizado (POP)

Título: Procedimentos para descarte de materiais biológicos
Número: FCF-IQ/USP/POP/BPE/1 Seção: 1.4 a 1.6
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas por todos os funcionários envolvidos em atividades de rotina executadas no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se ao descarte de resíduos biológicos gerados pelo BPE FCF/IQ USP.

Siglas:
POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

1- Seção de higiene e esterilização

1.4 Normas operacionais para o descarte de materiais biológicos não contaminados:

1. Recolher nas antecâmaras os materiais sujos gerados nas seções de produção e experimentação animal;
2. Na seção de higiene e esterilização, retirar os resíduos de maravalha, urina e fezes das caixas de animais;
3. Depositar os resíduos em sacos brancos de 90 litros identificados com o símbolo de risco biológico;
4. Lacrar os sacos;
5. Identificar os sacos com as seguintes informações: responsável, peso, data e observações pertinentes;
6. Acondicionar os sacos cheios no carrinho de mão;
7. No final do processo de raspagem das caixas, encaminhar os sacos com os resíduos biológicos até a lixeira de lixo hospitalar;
8. Anotar a quantidade de sacos no caderno de registro de descarte.

1.5 Normas operacionais para o descarte de carcaças de animais não contaminadas:

1. Depositar as carcaças de animais em sacos brancos identificados com o símbolo de risco biológico;
2. Lacrar os sacos;
3. Identificar os sacos com as seguintes informações: gerador, peso, data e observações pertinentes;
4. Acondicionar os sacos no *freezer*;
5. Retirar os sacos do *freezer* nos dias de coleta pela empresa contratada para descarte;
6. Anotar a quantidade de sacos no caderno de registro de descarte.

1.6 Normas operacionais para o descarte de materiais biológicos e carcaças contaminados:

1. Embalar em sacos apropriados para autoclavação todos os materiais que entraram em contato com o animal contaminado, tais como: gaiolas, grades, bebedouros e maravalha;
2. Para resíduos pesados e úmidos, utilizar sacos duplos;
3. Após a eutanásia dos animais contaminados, embalar a carcaça em saco apropriado para autoclavação;
4. Introduzir as embalagens com material biológico contaminado na autoclave de dupla porta pelo lado da seção de experimentação;
5. Esterilizar as embalagens por meio do processo de autoclavação na autoclave 4 (seção de experimentação);
6. Retirar o material autoclavado pelo lado da seção de higiene e esterilização;
7. Proceder conforme a instrução 1.4 (itens 5 a 8) para resíduos e a 1.5 (itens 4 a 6) para carcaças.

## Anexo 6. Procedimento Operacional Padronizado (POP)

Título: Procedimentos para eutanásia
Número: FCF-IQ/USP/POP/BPE/1 Seção: 1.7 a 1.9
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas por todos os funcionários envolvidos em atividades de rotina executadas na seção de higiene e esterilização do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se aos procedimentos de eutanásia de camundongos, ratos e coelhos. Os procedimentos de eutanásia são realizados na seção de higiene e esterilização do BPE FCF-IQ/USP.

Siglas:
POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

1 – Seção de higiene e esterilização

1.7 Procedimentos para eutanásia de camundongos:

1. Girar a chave preta do manômetro, para cima para permitir a saída do gás $CO_2$;
2. Abrir a câmara de $CO_2$ e colocar a gaiola com o(s) animal(is);
3. Fechar a câmara;
4. Girar a chave preta da câmara de $CO_2$ para cima;
5. Aguardar a finalização do procedimento de eutanásia do(s) animal(is);
6. Girar a chave preta da câmara de $CO_2$ para baixo;
7. Certificar-se de que o animal está morto observando a ausência de sinais vitais;
8. Girar a chave preta do manômetro para baixo, a fim de parar a saída do gás $CO_2$;
9. Acondicionar a carcaça em saco branco de resíduo biológico;
10. Anotar no caderno de registro de descarte de resíduos e eutanásia.

1.8 Procedimentos para eutanásia de ratos:

1. Girar a chave preta do manômetro para cima, para permitir a saída do gás $CO_2$;
2. Abrir a câmara de $CO_2$ e colocar a gaiola com o(s) animal(is);
3. Fechar a câmara;
4. Girar a chave preta da câmara de $CO_2$ para cima;
5. Aguardar a finalização do procedimento de eutanásia do(s) animal(is);
6. Girar a chave preta da câmara de $CO_2$ para baixo;
7. Certificar-se de que o animal está morto observando a ausência de sinais vitais;
8. Girar a chave preta do manômetro para baixo, a fim de parar a saída do gás $CO_2$;
9. Acondicionar a carcaça em saco branco de resíduo biológico;
10. Anotar no caderno de registro de descarte de resíduos e eutanásia.

1.9 Procedimentos para eutanásia de coelhos:

1. Pesar o animal;
2. Dosar na mesma seringa a dose anestésica de cetamina e xilazina conforme a tabela abaixo:

| *Peso do coelho* | *Cetamina 10% (35mg/kg)* | *Xilazina 2% (5mg/kg)* |
|---|---|---|
| 2,5 kg | 0,88 mL | 0,63 mL |
| 3,0 kg | 1,05 mL | 0,75 mL |
| 3,5 kg | 1,23 mL | 0,88 mL |
| 4,0 kg | 1,40 mL | 1,00 mL |
| 4,5 kg | 1,58 mL | 1,13 mL |
| 5,0 kg | 1,75 mL | 1,25 mL |

3. Administrar o anestésico no animal por via subcutânea (com agulha 25 x 7);
4. Aguardar até o animal entrar em anestesia profunda (verificada por meio dos reflexos digitais e do globo ocular).
5. Administrar mais uma dose anestésica no animal.
6. Esperar o anestésico fazer efeito (cerca de 10 a 20 minutos);
7. Colocar o animal na câmara de $CO_2$ conforme procedimento descrito nos itens 1.7 e 1.8.

## Anexo 7. Procedimento Operacional Padronizado (POP)

Título: Introdução dos sacos de ração na seção de produção
Número: FCF-IQ /USP/POP/BPE/1 Seção: 1.10 a 1.12
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas por todos os funcionários envolvidos em atividades de rotina executadas na seção de higienização e esterilização do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se à introdução dos sacos de ração para roedores de laboratório na seção de Produção do BPE FCF-IQ/USP.

Siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

1 – Seção de higiene e esterilização

1.10 Procedimentos para desinfecção dos sacos de ração:

1. Na sala de estoque de ração, separar os sacos que serão fornecidos para a seção de produção;
2. Pulverizar os sacos de ração com álcool 70%;
3. Pulverizar o carrinho de transporte com álcool 70%;
4. Acondicionar os sacos de ração no carrinho de transporte;
5. Levar o carrinho de transporte com os sacos de ração até a antecâmara da seção de produção.

1.11 Procedimentos para a introdução dos sacos de ração na seção de produção:

1. Verificar se a antecâmara foi descontaminada;

2. Abrir a porta da antecâmara e retirar os sacos de ração do carrinho de transporte, colocando-os dentro da antecâmara;
3. Pulverizar novamente os sacos de ração com álcool 70%;
4. Fechar a antecâmara;
5. Avisar ao técnico da seção de produção que será responsável pelo recebimento da ração.

1.12 Procedimentos para recebimento dos sacos de ração na seção de produção:

1. Entrar na antecâmara através da porta que se comunica com a seção de produção;
2. Retirar a embalagem plástica que reveste cada saco de ração;
3. Introduzir os sacos de ração na seção de produção e acondicioná-los na sala de estoque de ração desta seção.
4. Deixar a seção de produção através da antecâmara.

**Anexo 8. Procedimento Operacional Padronizado (POP)**

Título: Procedimentos para acesso à seção de produção de animais SPF
Número: FCF-IQ/POP/BPE/2 Seção: 2.1 a 2.2
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas pelos funcionários antes de iniciar as atividades de rotina na seção de produção de ratos e camundongos.

Aplicação:
Aplica-se ao conhecimento dos procedimentos para acesso à seção de produção do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Siglas:
São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

SPF – *Specified Pathogen Free*

2- Seção de produção

1.1 Banho:

1. Retirar o avental e colocá-lo no cabide da antecâmara (fora do vestiário);
2. Retirar os sapatos e guardá-los na sapateira (fora do vestiário);
3. Colocar o chinelo que se encontra na sapateira;
4. Ao entrar no vestiário, despir-se e guardar a roupa no armário;
5. Retirar todos os pertences como: joias, relógios, celular e outros objetos;
6. Tomar o banho com touca e utilizar o sabonete líquido fixado na parede do boxe;
7. No caso das mulheres, retirar toda a maquiagem durante o banho.
8. Sair do outro lado do boxe e utilizar uma toalha limpa e esterilizada.

1.2 Paramentação após o banho:

1. Colocar a cueca/calcinha descartável e o uniforme (macacão) esterilizado;
2. Pôr a máscara e a outra touca esterilizada em cima da touca colocada anteriormente;
3. Calçar a sapatilha e o chinelo limpos e previamente descontaminados;
4. Usar as luvas de procedimento;
5. Higienizar as luvas com álcool gel;
6. Sair do vestiário e colocar outro par de luvas em cima das anteriores;
7. Usar o calçado próprio para o trabalho em salas limpas.

**Anexo 9. Procedimento Operacional Padronizado**

Título: Procedimentos para preparo de material na seção de produção de animais SPF
Número: FCF-IQ/POP/BPE/2 Seção: 2.3 a 2.4
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas pelos funcionários envolvidos em atividades de rotina na sala de preparo de material.

Aplicação:
Aplica-se ao conhecimento dos procedimentos de rotina realizados na sala de preparo de material na seção de produção do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Siglas:
São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

2- Seção de produção

SPF – *Specified Pathogen Free*

2.3 Recebimento de material esterilizado por autoclave:

1. Aguardar e observar a finalização de cada ciclo de esterilização das autoclaves;
2. Abrir a autoclave e retirar o material esterilizado utilizando os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) recomendados (luvas para manuseio de material em alta temperatura e máscara protetora para o rosto);
3. Colocar cada material em seu lugar de estoque apropriado (caixas para rato, caixas para camundongo, bebedouros, grades, tampas, maravalha, uniforme, pano de limpeza, EPIs);

4. Fechar a autoclave e comunicar a seção de esterilização para abastecer a autoclave novamente;
5. Aguardar os próximos ciclos e repetir o procedimento descrito.

2.4 Preparo de material

1. Caixas:
   a) Abrir o saco de maravalha esterilizada com o auxílio de uma tesoura;
   b) Colocar as caixas em fileiras na altura do abdome e preencher as caixas com maravalha;
   c) Retirar as gaiolas com maravalha e formar uma nova pilha de caixas;
   d) Estocar as caixas com maravalha para serem utilizadas nos dias de troca;
   e) No final do procedimento, anotar na planilha de consumo a quantidade de sacos de maravalha utilizados naquele dia.

2. Bebedouros:
   a) Abrir a autoclave e retirar o carrinho com bebedouros da autoclave utilizando o suporte apropriado;
   b) Aguardar o resfriamento total;
   c) Retirar cada bebedouro do suporte e armazenar na estante para estoque de bebedouro;
   d) Armazenar os bebedouros para ratos (700 mL) e para camundongos (300 mL) separadamente.

3. Ração:
   a) Abrir o saco de ração e colocá-la sobre a peneira;
   b) Peneirar a ração;
   c) Despejar a ração peneirada no carrinho apropriado;
   d) Colocar a tampa e deixar o carrinho na sala de estoque de ração;
   e) Anotar na planilha de controle a quantidade de sacos utilizados e o número do lote de fabricação da ração.

**Anexo 10. Procedimento Operacional Padronizado (POP)**

Título: Procedimentos de rotina nas salas de criação de animais da seção de produção de animais SPF mantidos em sistema de alojamento *open cage*
Número: FCF-IQ/POP/BPE/2 Seção: 2.5 a 2.7
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas pelos funcionários envolvidos em atividades de rotina em salas de produção de ratos e camundongos.

Aplicação:
Aplica-se ao conhecimento dos procedimentos de rotina na seção de produção do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP.

Siglas:
São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

2- Seção de produção

SPF – *Specified Pathogen Free*

2.5 Troca das gaiolas sujas de animais:

1. Transportar as gaiolas limpas da sala de estoque de material para a sala de animais através do corredor para fluxo de material limpo;
2. Colocar uma gaiola limpa em cima do carrinho auxiliar;
3. Retirar da estante a gaiola suja a ser trocada e colocá-la no carrinho auxiliar, ao lado da gaiola limpa;
4. Verificar a ficha de registro da gaiola, observando nascimentos, desmames e quantidade de animais na gaiola;
5. Retirar o bebedouro e colocá-lo em carrinho para bebedouros usados que serão encaminhados para a seção de higiene e esterilização;
6. Retirar a grade da gaiola suja e apoiá-la na gaiola limpa que vai substituí-la;
7. Transportar os animais cuidadosamente para a gaiola limpa, manuseando-os individualmente.

8. Em caso de nascimento, realizar a sexagem dos neonatos e registrar na ficha da gaiola a data do parto, o número de filhotes nascidos e a quantidade de machos e fêmeas;
9. Visualizar os animais durante o manuseio, verificando se apresentam sinais de doença ou qualquer alteração que possa comprometer a reprodução ou causar dor e desconforto ao animal;
10. Tampar a gaiola limpa com a grade;
11. Registrar, na ficha da gaiola, a existência de filhotes mortos, raquitismo, canibalismo ou anormalidade;
12. Higienizar a estante com um pano (próprio da sala) umedecido com álcool 70%;
13. Retornar a gaiola limpa ao local de onde foi retirada da estante;
14. Registrar qualquer ocorrência no relatório de ocorrências da colônia que se encontra em cada sala de produção;
15. Repetir os procedimentos acima para todas as gaiolas existentes na sala;
16. Transportar, pelo corredor de fluxo de material sujo, o carrinho com bebedouros usados e as gaiolas sujas até o *air-lock*, de onde serão transferidas para a seção de higiene e esterilização por um funcionário dessa seção.

2.6 Reabastecimento de água e ração das gaiolas:

1. Transportar os bebedouros limpos e esterilizados em carrinhos apropriados da sala de estoque de materiais para a sala de animais através do corredor para fluxo de material limpo;
2. Verificar se o bebedouro está bem tampado e com a vazão correta de água;
3. Colocar o bebedouro no local apropriado na grade das gaiolas;
4. Transportar o carrinho de ração até a sala dos animais e abastecer todas as gaiolas;
5. Verificar se todas as gaiolas foram abastecidas com água e ração suficientes para a próxima troca.

2.7 Limpeza da sala:

1. Materiais:

   Rodo
   Caixa de polipropileno
   Pano próprio para o rodo
   Pano para limpeza de carrinhos auxiliares
   Solução de hipoclorito de sódio a 0,5%
   Álcool 70%

2. Procedimentos para a limpeza das salas:
   a) Realizar a limpeza com cuidado, evitando ruídos e procedimentos que possam causar estresse aos animais;
   b) Descontaminar o carrinho auxiliar com álcool 70%;
   c) Limpar e descontaminar o piso da sala com o auxílio de um rodo e pano apropriado embebido na solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, realizando uma varredura úmida.

## Anexo 11. Procedimento Operacional Padronizado (POP)

Título: Procedimentos de rotina nas salas de criação de animais da seção de produção de animais SPF mantidos em sistema de alojamento “IVC”
Número: FCF-IQ/POP/BPE/2 Seção: 2.8 a 2.10
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas pelos funcionários envolvidos em atividades de rotina em salas de produção de camundongos mantidos em *racks* ventilados.

Aplicação:
Aplica-se ao conhecimento dos procedimentos de rotina na seção de produção do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Siglas:
São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

2 – Seção de produção

SPF – *Specified Pathogen Free*

*IVC – Individually Ventilated Cage*

2.8 Procedimentos com a estação de troca:

1. Ligar a estação de troca e aguardar 15 minutos para a estabilização da área de trabalho;
2. Aguardar a finalização do indicativo sonoro, emitido durante a estabilização do campo, para iniciar as atividades na estação de troca;
3. Realizar a descontaminação da área de trabalho com álcool 70%;
4. Ligar a iluminação da estação de troca;
5. Realizar todo o procedimento dentro da área de trabalho;

6. Caso algum objeto ou animal seja manuseado fora da área de trabalho, será emitido o indicativo sonoro.

2.9 Troca das gaiolas sujas de animais:

1. Transportar as gaiolas limpas da sala de estoque de material para a sala de animais através do corredor para fluxo de material limpo;
2. Colocar uma gaiola limpa na estação de troca;
3. Retirar uma gaiola suja a ser trocada do *rack* ventilado e colocá-la na estação de troca;
4. Retirar a tampa-filtro da gaiola limpa, sem tocar na parte interna da tampa, e apoiá-la dentro da estação de troca com o fundo virado para cima;
5. Retirar a tampa-filtro da gaiola suja sem tocar na parte interna da tampa;
6. Descontaminar as luvas com álcool 70%;
7. Abrir a grade da gaiola suja mantendo-a apoiada na caixa;
8. Retirar o bebedouro e colocá-lo em carrinho para bebedouros usados que serão encaminhados para a seção de higiene e esterilização;
9. Abrir a grade da gaiola limpa mantendo-a apoiada na caixa;
10. Descontaminar as luvas com álcool 70%;
11. Transportar os animais cuidadosamente para a gaiola limpa, manuseando-os individualmente, sem tocar na parte externa das gaiolas;
12. Verificar a ficha de registro da gaiola, observando nascimentos, desmames e quantidade de animais na gaiola;
13. Visualizar os animais durante o manuseio, verificando se apresentam sinais de doença ou qualquer alteração que possa comprometer a sua reprodução ou causar-lhes dor e desconforto;
14. Identificar o sexo dos neonatos se houver nascimentos e registrar na ficha da gaiola a data do parto, o número de filhotes nascidos e a quantidade de machos e fêmeas;
15. Descontaminar as luvas com álcool 70%;
16. Fechar a grade da gaiola limpa;
17. Abastecer a gaiola com água e ração;
18. Fechar a gaiola com a tampa-filtro;
19. Retirar a gaiola suja da estação de troca;
20. Retornar a gaiola limpa com os animais ao local de onde foi retirada da estante ventilada;
21. Registrar qualquer ocorrência no relatório de ocorrências da colônia que se encontra em cada sala de produção;
22. Repetir os procedimentos acima para todas as gaiolas existentes na sala;
23. Descontaminar as luvas antes de manusear qualquer material limpo após ter manipulado material sujo ou a parte externa das gaiolas;
24. Após o término da troca das gaiolas, verificar se todas as gaiolas estão abastecidas com água e ração;

25. Transportar, pelo corredor de fluxo de material sujo, o carrinho com bebedouros usados e as gaiolas sujas até o *air-lock*, de onde serão transferidas para a seção de higiene e esterilização por um funcionário dessa seção;
26. Verificar se as válvulas das gaiolas estão conectadas corretamente nos difusores da estante;
27. Observar a saturação dos filtros do *rack* ventilado pelo indicativo luminoso no painel.

2.10 Limpeza da sala:

1. Materiais:

Rodo
Caixa de polipropileno
Pano próprio para o rodo
Pano para limpeza de carrinhos auxiliares
Solução de hipoclorito de sódio a 0,5%
Álcool 70%

2. Procedimentos para a limpeza das salas:

a) Realizar a limpeza com cuidado, evitando ruídos e procedimentos que possam causar estresse aos animais;
b) Descontaminar o carrinho auxiliar com álcool 70%;
c) Limpar e descontaminar o piso da sala com o auxílio de um rodo e pano apropriado embebido na solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, realizando uma varredura úmida.

**Anexo 12. Procedimento Operacional Padronizado (POP)**

Título: Procedimento para a manutenção de colônias isogênicas (*inbred*)
Número: FCF-IQ/POP/BPE/2 Seção: 2.11 a 2.15
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece procedimentos que devem ser aplicados por todos os funcionários responsáveis por colônias isogênicas na seção de produção do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se à manutenção de colônia de ratos e camundongos isogênicos, a fim de garantir o padrão genético.

Siglas:
São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

2- Seção de produção

2.11 Sistema de acasalamento para a colônia de fundação:

1. Deve ser mantida apenas com acasalamentos entre irmão e irmã;
2. Utilizar o sistema monogâmico intensivo;
3. Manter um número de cinco a dez casais fundadores;
4. Após seis meses da data de acasalamento, os casais devem ser renovados;
5. Reservar os filhotes do casal que apresentarem melhor desempenho reprodutivo para perpetuação da linhagem. Estes serão os futuros reprodutores da colônia de fundação.

2.12 Sistema de acasalamento para a colônia de expansão:

1. Deve ser mantida através de acasalamentos entre irmãos ou primos;
2. Utilizar o sistema poligâmico intensivo;
3. Manter o número de reprodutores suficientes para fornecimento dos animais solicitados no semestre;
4. Após seis meses da data de acasalamento, os casais devem ser renovados.

2.13 Procedimento para a realização do acasalamento:

1. Separar o material necessário para o acasalamento (caixas, grades, fichas de registro);
2. Realizar acasalamentos na proporção de uma fêmea para um macho em colônia de fundação e na proporção de um macho para duas fêmeas na colônia de expansão;
3. Colocar primeiramente o macho na gaiola;
4. Colocar a(s) fêmea(s) na gaiola com o macho;
5. Registrar na ficha de identificação de cada gaiola: tipo da colônia, linhagem, data de nascimento do macho e da fêmea, data do acasalamento, proporção de fêmeas por macho;
6. Registrar no mapa genético o número do casal formado seguindo a sequência das gerações.

2.14 Desmame dos filhotes:

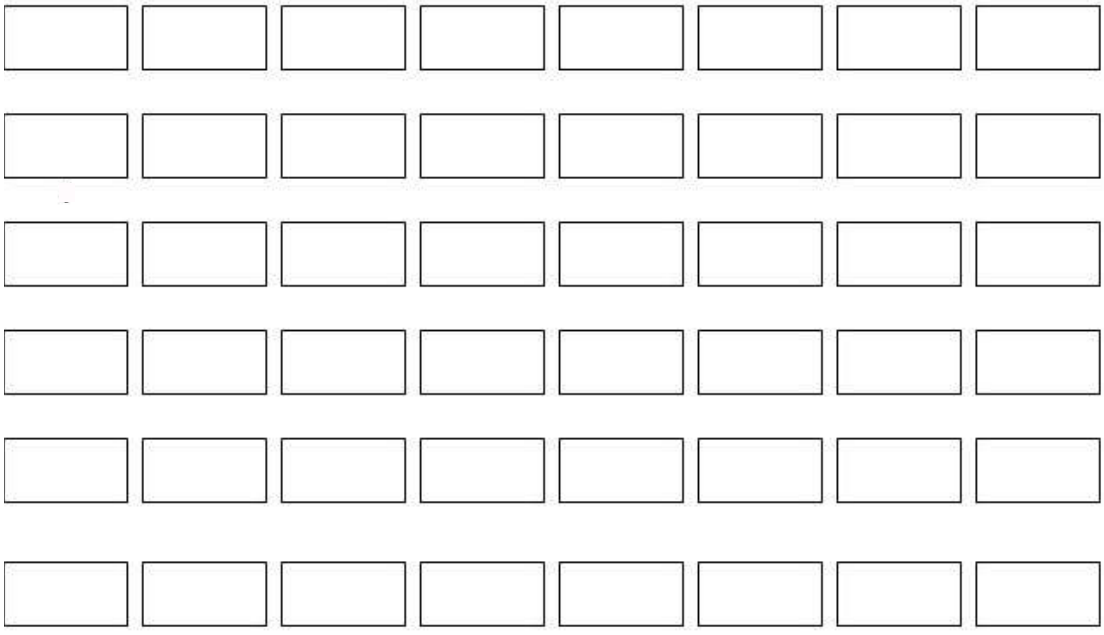
1. Desmamar os filhotes de cada casal separadamente;
2. Colocar machos e fêmeas em gaiolas separadas;
3. Manter sempre o número de animais por gaiola recomendado para a espécie;
4. Registrar na ficha do casal o número de animais de cada sexo desmamados e a data do desmame;
5. Colocar uma ficha de registro para cada gaiola com os dados: linhagem, data de nascimento, data de desmame, quantidade de animais, sexo e número dos pais;
6. Realizar o mesmo procedimento para todos os casais que tiverem filhotes para desmame.

2.15 Modelo de mapa genético da linhagem:

COLONIA DE ANIMAIS ISOGENICOS

LINHAGEM_____ INICIO _____

COLÔNIA_____ TÉRMINO_____



**Anexo 13. Procedimento Operacional Padronizado (POP)**

Título: Procedimento para a manutenção de colônias heterogênicas (*outbred*)
Número: FCF-IQ/POP/BPE/2 Seção: 2.16 a 2.19
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece procedimentos que devem ser aplicados por todos os funcionários responsáveis por colônia heterogênica na seção de produção do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se à manutenção de colônia de ratos e camundongos heterogênicos, a fim de garantir o padrão genético.

Siglas:
São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

2- Seção de produção

2.16 Sistema de acasalamento para a colônia de fundação:

1. A colônia fundadora deve ser mantida apenas mediante acasalamentos entre indivíduos não aparentados;
2. Utilizar o sistema descrito por Poiley (1960), que distribui os casais em grupo e, assim, os acasalamentos são feitos entre indivíduos de grupos diferentes;
3. Utilizar o sistema de acasalamento monogâmico intensivo;Devem ser mantidos no mínimo 25 casais divididos em no mínimo 5 grupos;
4. Manter os casais juntos até o fim da vida reprodutiva;
5. Após seis meses da data de acasalamento, os casais devem ser renovados;
6. Reservar os filhotes de todos os casais para perpetuação da linhagem. Estes serão os futuros reprodutores da colônia de fundação.

2.17 Sistema Poiley

| Grupo proveniente | | Grupo a formar |
|---|---|---|
| Machos | Fêmeas | |
| B | C | A |
| C | D | B |
| D | E | C |
| E | A | D |
| A | B | E |

2.18 Procedimento para a realização do acasalamento:

1. Separar o material necessário para o acasalamento (caixas, grades, fichas de registro);
2. Realizar acasalamentos na proporção de uma fêmea para um macho;
3. Colocar primeiramente o macho na gaiola;
4. Colocar a fêmea na gaiola com o macho;
5. Registrar, na ficha de identificação de cada gaiola, o tipo da colônia, a linhagem, a data de nascimento do macho e da fêmea, a data do acasalamento, a proporção de fêmeas por macho e a geração;
6. Após seis meses da data de acasalamento, os casais devem ser renovados.

2.19 Desmame dos filhotes:

1. Desmamar os filhotes de cada casal separadamente;
2. Colocar machos e fêmeas em gaiolas separadas;
3. Manter sempre o número de animais por gaiola recomendado para a espécie;
4. Registrar na ficha do casal o número de animais de cada sexo desmamados e a data do desmame;
5. Colocar uma ficha de registro para cada gaiola com os seguintes dados: linhagem, data de nascimento, data de desmame, quantidade de animais, sexo, número dos pais e letra do grupo a que pertence;
6. Realizar o mesmo procedimento para todos os casais que tiverem filhotes para desmame.

**Anexo 14. Procedimento Operacional Padronizado (POP)**

Título: Procedimentos para o acasalamento programado de ratos
Número: FCF-IQ/POP/BPE/2 Seção: 2.20 a 2.21
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece procedimentos que devem ser aplicados por todos os funcionários responsáveis por colônias de ratos que necessitem da realização de acasalamentos programados na seção de produção do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se ao sistema de acasalamento programado utilizado na expansão de colônia de ratos para a entrega programada de lotes de animais com exigência de peso e data definida.

Siglas:
São usadas no texto deste Pop as seguintes siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

2- Seção de produção

2.20 Sistema de acasalamento programado:

1. Utilizar esse sistema para fornecimento de lotes de animais com peso homogêneo e data definida;
2. Calcular a quantidade necessária de reprodutoras a serem acasaladas de acordo com o número de animais solicitados;
3. O cálculo deve ser feito considerando os parâmetros de fertilidade e prolificidade da linhagem acrescentando 10% do número de animais, para garantir a quantidade em caso de perda de filhotes e infertilidade;
4. Considerar nascimento de 50% de filhotes de cada sexo por reprodutora;

5. O acasalamento dever ser realizado com antecedência, considerando: cópula + período de gestação da espécie + amamentação + idade dos animais solicitados.

2.21 Procedimentos para a realização do acasalamento:

1. Separar o material necessário para o acasalamento (caixas, grades, fichas de registro);
2. Realizar acasalamentos na proporção de três fêmeas para um macho;
3. Colocar primeiramente o macho na gaiola;
4. Colocar as fêmeas na gaiola com o macho;
5. Registrar na ficha de identificação de cada gaiola: linhagem, data de nascimento do macho e das fêmeas, data do acasalamento e proporção de fêmeas por macho;
6. Identificar o tipo de acasalamento e o destino dos filhotes com data prevista para fornecimento;
7. Manter o macho com as fêmeas durante um ciclo estral e retirar os machos no sexto dia após a data do acasalamento;
8. Após 15 dias da data do acasalamento, será possível visualizar a prenhez e deve-se separar uma fêmea por gaiola até o 19º após o acasalamento;
9. Após dois dias do nascimento dos filhotes, realizar a sexagem dos filhotes e manter os animais de interesse;
10. Aos 21 dias de idade, os filhotes devem ser desmamados, pesados individualmente e separados por sexo, mantendo cinco animais em cada gaiola.

## Anexo 15. Procedimento Operacional Padronizado (POP)

Título: Procedimentos para a manutenção da colônia de ratos SOD1
Número: FCF-IQ/POP/BPE/2 Seção: 2.22 a 2.25
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece procedimentos que devem ser aplicados para a manutenção da colônia de ratos SOD1 na Seção de produção do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se à colônia de ratos SOD1, modelo geneticamente modificado, com a finalidade de garantir as características do modelo animal.

Siglas:
São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

2- Seção de produção

2.22 Manutenção da colônia de fundação:

1. Manter a colônia por meio de acasalamentos entre machos ALS positivos com fêmeas SD (dez casais por geração);
2. Acasalar os animais com dois meses e meio de idade no máximo, pois a partir dos três meses de idade pode iniciar o desenvolvimento dos sintomas e apresentar o fenótipo da doença. Nesse momento já não são capazes de se reproduzir em virtude da paralisia dos membros e da dificuldade de locomoção;
3. Utilizar o sistema monogâmico e manter os casais juntos até o momento em que seja possível constatar a prenhez;

4. Ao separar os reprodutores machos das fêmeas, mantê-los na seção de produção, devidamente identificados, para verificar o início dos sintomas;
5. Registrar no caderno as características dos sintomas com os seguintes dados: o número do animal, a data de nascimento, a data de início dos sintomas, a descrição dos sintomas de paralisia, a data de descarte ou do fornecimento caso algum grupo de pesquisadores tenha interesse;
6. Comunicar, a cada renovação da colônia, todos os grupos de pesquisadores que utilizam a linhagem sobre a previsão de nascimento dos filhotes e provável data de desmame e genotipagem;
7. Os grupos de pesquisadores devem se reunir e decidir quem vai utilizar aquela ninhada;
8. Quando estiver próximo ao desmame, agendar e informar aos pesquisadores o dia para fazer a coleta de tecido dos filhotes para posterior genotipagem;
9. Desmamar os animais e identificá-los com o número dos pais individualmente. Todos os animais devem ser identificados com tintura hena, seguindo a numeração da última geração para machos e fêmeas, conforme registros;
10. Após realizar a coleta de tecido para genotipagem (descrição em 2.20), enviar aos pesquisadores o relatório dos sintomas dos reprodutores e a relação de pais e filhos (numeração de cada um). A seleção dos futuros reprodutores é feita pelos pesquisadores de acordo com o desenvolvimento dos sintomas e de acordo com o interesse da pesquisa;
11. O grupo de pesquisadores deverá enviar o resultado da genotipagem (animais ALS positivos e negativos) e a seleção dos animais para reprodução e pesquisa. A idade dos animais para início dos experimentos dependerá do grupo.

2.23 Procedimento para a coleta de tecido e genotipagem:

1. Nascimento e genotipagem dos filhotes:

   Nascem em média 12 filhotes por reprodutora dos quais 50% deverão ser afetados, mas não apresentam fenótipo que possa identificá-los antes dos 90 dias de idade.

2. Método utilizado para a coleta de amostra de tecido:

a) Desmamar separadamente cada ninhada, identificando o número dos pais;

b) Identificar individualmente os filhotes de cada pai com marcações distintas (identificação feita com pincel e hena) e numerá-los seguindo a sequência das gerações anteriores;

c) Identificar os *eppendorfs* com o número e o sexo de cada animal;

d) Coletar uma amostra de tecido da orelha com o auxílio de pinça e tesoura esterilizadas e individuais para cada animal. Colocar a amostra no *eppendorf* correspondente àquele

animal;

e) Armazenar os *eppendorfs* com as amostras de tecido em gelo seco e enviá-los para o laboratório onde será realizada a genotipagem.

3. Recebimento do resultado da genotipagem

a) Selecionar os filhotes de acordo com o genótipo: ALS positivos e negativos, mantendo a numeração e a origem (número dos pais);

b) Separar os filhotes selecionados para reprodução e fornecimento conforme solicitação dos pesquisadores, mantendo a atenção para não agrupar animais com a mesma marcação em uma mesma gaiola.

2.24 Renovação da colônia:

1. Utilizar dez machos ALS positivos e dez fêmeas SD – *wild* nascidos na mesma época. As datas dos nascimentos dos filhotes de SOD1 com filhotes de SD precisam coincidir, para posteriormente serem acasalados entre si, programando as duas colônias em paralelo.
2. Seleção dos futuros reprodutores (2.19).
3. As fêmeas e os machos que não serão futuros reprodutores, ALS positivos e negativos, serão destinados a pesquisa.

2.25 Procedimentos para a realização do acasalamento:

1. Separar o material necessário para o acasalamento (caixas, grades, fichas de registro);
2. Realizar acasalamentos na proporção de uma fêmea para um macho;
3. Colocar primeiramente o macho na gaiola;
4. Colocar a fêmea na gaiola com o macho;
5. Registrar na ficha de identificação de cada gaiola: o tipo de colônia, a linhagem, a data de nascimento do macho e das fêmeas, a data do acasalamento e a proporção de fêmeas por macho;
6. Após o nascimento das ninhadas, realizar a sexagem dos filhotes e registrar na ficha da gaiola a data de nascimento e o número de machos e fêmeas nascidos;
7. Aos 21 dias de idade, desmamar os filhotes e separá-los por sexo, mantendo cinco animais/gaiola (ver seção 2.19 – item 8);
8. Fornecer os animais assim que o grupo de pesquisadores obtiver o resultado da genotipagem e/ou os animais atingirem a idade solicitada.

**Anexo 16. Procedimento Operacional Padronizado (POP)**

Título: Procedimentos para a manutenção da colônia de camundongos P2-GFP
Número: FCF-IQ/POP/BPE/2 Seção: 2.26 a 2.28
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece procedimentos que devem ser aplicados para a manutenção da colônia de camundongos P2-GFP na seção de produção do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se à colônia de camundongos P2-GFP, modelo geneticamente modificado, com a finalidade de garantir as características do modelo animal.

Siglas:
São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

2- Seção de produção

2.26 Manutenção da colônia de fundação:

1. Manter a colônia por meio de acasalamentos entre machos heterozigotos com fêmeas heterozigotas;

2. Manter a colônia seguindo os procedimentos para camundongos isogênicos (seção 2.8 a 2.12);

3. O desmame dos filhotes deve ser feito pelo número dos pais individualmente, e todos os animais devem ser identificados com o auxílio de um furador de orelha, seguindo a numeração da última geração;

4. Genotipar todos os filhotes para identificar a expressão do gene (homozigoto GFP; homozigoto 17 ou heterozigoto);

2.27 Procedimentos para a coleta de tecido e genotipagem:

1. Método utilizado para a coleta de amostra:

a) Identificar os *eppendorfs* com o número do animal identificado no desmame;

b) Coletar uma amostra de tecido da orelha com o auxílio de uma pinça e tesoura esterilizadas e individuais para cada animal;

c) Colocar a amostra no *eppendorf* correspondente àquele animal;

d) Armazenar os *eppendorfs* com as amostras de tecido em gelo seco e enviá-los para o laboratório onde será realizada a genotipagem.

2. Recebimento do resultado da genotipagem:

a) Assim que o laboratório enviar o resultado da genotipagem, separar os filhotes de acordo com a expressão do gene;

b) Reservar os heterozigotos irmãos para reprodução;

c) Encaminhar os animais com o genótipo homozigotos GFP e selvagem para experimentação.

2.28 Procedimentos para a realização do acasalamento (seção 2.11 a 2.15) – Anexo 12

**Anexo 17. Procedimento Operacional Padronizado (POP)**

Título: Procedimentos para a higienização de salas limpas
Número: FCF-IQ/POP/BPE/2 Seção: 2.29
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas pelos funcionários envolvidos em atividades de rotina em salas de produção de ratos e camundongos.

Aplicação:
Aplica-se ao conhecimento dos procedimentos de higienização de salas de produção, estoque, corredores e *air-locks* do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da USP (BPE FCF-IQ/USP).

Siglas:
São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

2- Seção de produção

2.29 Higienização de salas, corredores e antecâmaras:

1. Materiais:
   Rodo próprio para limpeza de parede (modelo Mop);
   Pano (refil) próprio para o rodo;
   Solução de cloreto de benzalcônio a 0,5%;
   Recipiente para armazenar a solução.

2. Preparo da solução de cloreto de benzalcônio a 0,5%:
   Procedimento para preparo de 1 litro da solução
   a) Colocar 5 mL de cloreto de benzalcônio no recipiente com o auxílio de uma seringa;
   b) Colocar 950 mL de água esterilizada no mesmo recipiente;

c) Misturar a solução até que fique completamente homogênea.

3. Procedimentos de limpeza:
   a) Utilizar óculos de segurança, além dos equipamentos de proteção individual utilizados em áreas limpas;
   b) Colocar o pano (refil) no rodo de limpeza;
   c) Umedecer o pano na solução de cloreto de benzalcônio a 0,5% sempre que necessário;
   d) Realizar primeiramente a limpeza do teto com movimento contínuo e em linha reta;
   e) Realizar a limpeza das paredes e portas com movimento contínuo e em linha reta;
   f) Realizar a limpeza do piso por meio da varredura úmida com a mesma solução.

**Anexo 18. Procedimento Operacional Padronizado (POP)**

Título: Procedimentos de rotina da seção de experimentação
Número: FCF-IQ/USP/POP/BPE/3 Seção: 3.1 a 3.4
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas por todo o pessoal (funcionários, pesquisadores e alunos) envolvidos em atividades de rotina dos animais que necessitem ser executadas nas dependências da seção de experimentação do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se ao conhecimento dos procedimentos de rotina do setor de experimentação do BPE da FCF-IQ/USP.

Siglas:
POP - Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

3- Seção de experimentação

3.1 Troca das gaiolas sujas de animais:

1. Transportar as gaiolas limpas da sala de estoque de material (sala de esterilização e descontaminação) para a sala de animais;
2. Colocar as gaiolas limpas em local próximo à estante cujas gaiolas serão trocadas;
3. Verificar a ficha de cada gaiola e os avisos deixados na sala pelo pesquisador para o funcionário;
4. Retirar da estante a gaiola suja a ser trocada e colocá-la na bancada auxiliar;
5. Retirar a grade da gaiola suja e apoiá-la na gaiola limpa que vai substituí-la;
6. Transportar os animais cuidadosamente para a gaiola limpa, manuseando-os individualmente;

7. Observar os animais durante o manuseio, verificando se apresentam sinais de doença ou qualquer alteração que comprometa sua permanência no Biotério; nesse caso, avisar imediatamente o pesquisador ou responsável;
8. Tampar a gaiola limpa e colocá-la no local de onde foi retirada da estante;
9. A estante e a grade devem ser descontaminadas com um pano (próprio da sala) embebido em álcool 70%;
10. Repetir os procedimentos acima para todas as gaiolas existentes na sala;
11. Transportar as gaiolas sujas para o corredor, de onde serão levadas para a sala da antecâmara e transferidas para a seção de higienização e esterilização;
12. Verificar a quantidade de ração e água em todas as gaiolas, repondo se for necessário;
13. Realizar a higienização da sala.

3.2 Reabastecimento de água e ração das gaiolas:

1. Transportar os bebedouros limpos (autoclavados) em carrinhos apropriados da sala de estoque de materiais (sala de esterilização e descontaminação) para a sala de animais;
2. Retirar os bebedouros sujos das gaiolas e colocá-los em carrinho apropriado para bebedouros sujos;
3. Verificar se o bebedouro está bem tampado e testar se está correta a vazão de água;
4. Colocar o bebedouro no local apropriado para bebedouro na grade das gaiolas, tomando o cuidado de verificar algum aviso do pesquisador quanto a não mexer na água;
5. Transportar o carrinho de bebedouros sujos até a sala da antecâmara, de onde serão encaminhados para a seção de higienização e esterilização;
6. Empurrar o carrinho de ração até a sala dos animais e abastecer todas as gaiolas, tomando o cuidado de verificar algum aviso do pesquisador quanto a não mexer na ração.

3.3 Limpeza da seção de experimentação:

1. Materiais:
   Rodo;
   Caixa de polipropileno;
   Pano próprio para o rodo;
   Pano para limpeza de bancadas;
   Solução de hipoclorito de sódio a 1%;
   Solução de hipoclorito de sódio a 0,5%;
   Saco plástico branco para lixo hospitalar.

2. Procedimentos para a limpeza das salas:
   1. A limpeza deve ser realizada com cuidado, evitando ruídos e procedimentos que possam causar estresse aos animais;
   2. Depois de cada troca das gaiolas, a sala deve ser limpa com o auxílio de um rodo com o pano apropriado embebido na solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, puxando toda a sujeira do chão (varredura úmida);
   3. Passar um pano apropriado (encontrado na própria sala) com álcool 70% nas bancadas e pias da sala;
   4. O lixo de toda a área deve ser retirado uma vez por dia e levado a sala da antecâmara.

3.4 Reabastecimento de materiais (sala de estoque):

3.4.1 Gaiolas:

1. Retirar da autoclave, as gaiolas para ratos, camundongos e gaiolas para microisoladores e colocá-las na sala para uso do pesquisador.

3.4.2 Bebedouros:

1. Retirá-los da autoclave e colocá-los na estante para bebedouros;
2. Um lado da estante é para bebedouros pequenos (300 mL) e o outro para bebedouros grandes (700 mL a 1 L).

3.4.3 Grades:

1. Colocá-las na estante para grades;
2. Formar pilhas diferentes para grades de ratos e camundongos.

3.4.4 Saco de lixo branco hospitalar:

1. Abastecer a estante com sacos de lixo branco hospitalar.

3.4.5 Fichas de identificação das gaiolas e suportes:

1. Abastecer a sala com fichas de identificação e suportes para fichas.

**Anexo 19. Procedimento Operacional Padronizado (POP)**

Título: Procedimentos para a manutenção de coelhos
Número: FCF-IQ/USP/POP/BPE/3 Seção: 3.5 a 3.11
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas por todos os funcionários envolvidos em atividades que necessitem ser executadas na seção para animais holoxênicos (coelhos).

Aplicação:
Aplica-se à manutenção de experimentos com coelhos.

Siglas:
POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

3- Seção de experimentação

3.5 Protocolos para coelhos:

1. O Biotério não mantém uma produção de coelhos. Estes devem ser adquiridos em granjas e/ou criadouros. Os coelhos recém-chegados passam por quarentena, que pode ser de duas a quatro semanas. Durante a quarentena, o animal permanece em observação para investigar possíveis doenças;
2. O pesquisador deverá preencher previamente o protocolo da experimentação, que está no site do Biotério (www.usp.br/bioterio);
3. As coletas de sangue são na veia auricular;
4. As inoculações são subcutâneas, devendo-se utilizar três a quatro pontos do dorso do animal, dependendo da quantidade de inóculo;
5. A idade ideal para a produção de anticorpos policlonais em coelhos é de três meses.

3.6 Antígeno:

1 Deve ser o mais purificado possível, contendo apenas os epítopos desejados, para produzir anticorpos de maior especificidade;
2 Deve estar livre de toxicidade para o animal (lipopolissacarídeos e resíduos químicos);
3 Deve ter pH fisiológico e estar estéril;
4 Deve estar nas concentrações adequadas. Para coelhos, a concentração correta é de 50-1.000 ug.

3.7 Adjuvante:

1 O Adjuvante Completo de Freund (ACF), composto de uma emulsão de água em óleo adicionada de *Mycobacterium SP*, deve ser evitado. Caso seja necessário, deve ser utilizado apenas na primeira imunização, e o Adjuvante Incompleto de Freund (AIF), nas imunizações subsequentes.

2 Após o uso do adjuvante de Freund, é recomendado:

- Limitar a concentração de *Mycobacterium* para 0,05 a 0,1mg/mL;

- Adicionar antígeno concentrado ao adjuvante e, desse modo, reduzir o volume de emulsão a ser inoculada;

- Manter a esterilidade da solução antigênica.

3 Alternativas ao ACF devem ser consideradas, por produzirem respostas inflamatórias menos intensas e apresentarem resposta imunológica equivalente com menor destruição de tecidos e granulomas. Veja alguns exemplos a seguir:

- TiterMax ou TiterMax Gold (CytRx, Norcross, GA);

- Ribi Adjuvant System (RAS – Corixa Corporation, Seattle, WA);

- Syntex Adjuvant Formulation (SAF, SAF-1, SAF-m – Charion Corporation, Emeryville, CA);

- Gerbu Adjuvants (GERBU Biochemicals GmbH, Gaiberg, Germany);

- Immune-Stimulating Complexes (ISCOMs);

- Aluminum Salt Adjuvants.

3.8 Coleta de sangue pela veia auricular:

1. Com o animal imobilizado na caixa de contenção, realiza-se a dilatação do vaso com uma luz infravermelha. Após a dilatação, fazer assepsia com álcool 70% e introduzir a agulha no vaso central ou no vaso marginal;
2. Para o pré-imune e nas coletas somente para verificação das quantidades de anticorpos, são coletados de 3 mL a 5 mL;

3. Para a coleta final em que o coelho será submetido a eutanásia, coloca-se o animal na caixa de contenção e realiza-se a dilatação do vaso com uma luz infravermelha. Após a dilatação, fazer assepsia com álcool 70% e introduzir a agulha no vaso central ou no vaso marginal; são coletados de 30 mL a 40 mL. Após a coleta de sangue final, o animal será submetido a eutanásia, como descrito no item 3.12.

3.9 Procedimentos para a inoculação:

1. Para a inoculação, o animal é apoiado em uma mesa, na qual um funcionário o segura apenas para evitar que ele se mova durante a inoculação, enquanto o outro funcionário realiza a aplicação subcutânea do inóculo, utilizando 4 a 5 pontos do dorso do animal, dependendo da quantidade inoculada;
2. Após o término do experimento, os animais sofrerão eutanásia.

3.10 Eutanásia para coelhos:

1 Ver Anexo 6 – Procedimentos para eutanásia.

3.11 Normas operacionais para o trabalho em área de manutenção de coelhos:

1 As trocas e a higienização das salas, estantes e gaiolas devem ser realizadas nas segundas, quartas e sextas-feiras, porém, nas quartas-feiras, somente devem ser trocadas as bandejas e gaiolas mais sujas;

2 Retirar as bandejas e bebedouros sujos, substituindo-os por limpos e previamente preparados pelos funcionários da seção de higiene e esterilização;

3 Devem ser observadas, durante as trocas, as condições dos animais (fezes, urina, olhos, nariz, orelhas e patas). Os animais que apresentarem algum sintoma anormal devem ser registrados, e o funcionário deverá comunicar a chefia para as devidas providências;

4 A verificação da água e ração é diária;

5 O cocho deve ser lavado toda semana;

6 A desinfecção geral da sala vazia, inclusive de paredes e pisos, deve ser realizada a cada 15 dias;

7 A sala é lavada e descontaminada com solução de cloreto de benzalcônio a 0,5% ou hipoclorito de sódio a 1%.

**Anexo 20. Procedimento Operacional Padronizado (POP)**

Título: Procedimentos para anestesia inalatória com isoflurano
Número: FCF-IQ/USP/POP/BPE/3 Seção: 3.12 a 3.17
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por: Data:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas por todos os funcionários e pesquisadores envolvidos em atividades de rotina executadas na seção de experimentação do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se aos procedimentos de anestesia inalatória com isoflurano em camundongos e ratos realizados na seção de experimentação do BPE FCF/IQ USP.

Siglas:
POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

3- Seção de experimentação

3.12 Utilização da técnica:

1. Aplicar a anestesia inalatória somente após realização de treinamento adequado;
2. Usar a anestesia inalatória como primeira opção de anestesia em ratos e camundongos;
3. Utilizar a anestesia inalatória para a contenção humanitária de animais durante a realização de pequenos procedimentos (como coleta de sangue, inoculação, biópsias etc.) e em procedimentos cirúrgicos;
4. Aplicar a anestesia inalatória quando for necessário produzir a mínima metabolização pelo fígado e a menor toxicidade ao organismo do animal.

3.13 Procedimentos para a anestesia inalatória com isoflurano em ratos e camundongos:

1. Realizar os procedimentos de anestesia inalatória somente após treinamento,

em aparelho localizado dentro da capela para exaustão de gases, na sala de procedimentos da seção de experimentação;

2. Verificar previamente se há quantidades de oxigênio e isoflurano suficientes para todo o procedimento.
3. Ligar a iluminação e exaustão de ar da capela aonde se encontra o aparelho de anestesia inalatória;
4. Conectar o sistema à câmara de indução anestésica;
5. Colocar a quantidade necessária de isoflurano no aparelho com o auxílio de uma seringa de 3 mL (a quantidade vai variar de acordo com a espécie, o número de animais e a duração da anestesia);
6. Ligar o suprimento de gás oxigênio;
7. Ajustar o fluxômetro entre 500 mL e 1.000 mL por minuto;
8. Colocar o animal na câmara de indução e fechar a tampa;
9. Ajustar o vaporizador para 4-5%;
10. Monitorar o animal até a completa sedação (cerca de 1 minuto para camundongos e 2 minutos para ratos) conforme descrito no item 1.6. Inicialmente, a taxa respiratória vai aumentar e, depois, diminuir. O animal apresentará falta de reflexo de endireitamento (mediante suave tombamento da câmara de indução);
11. Permitir que o animal permaneça na câmara de indução por aproximadamente 10 segundos antes de prosseguir;
12. Conectar o sistema à máscara facial;
13. Cuidadosamente, retirar o animal da câmara de indução e posicioná-lo na máscara facial sobre uma superfície limpa e, de preferência, sobre um pano limpo, para não perder muito calor. Essa etapa não deve demorar, pois de 1 a 3 minutos o animal começa a despertar;
14. Recolocar a tampa na câmara de indução imediatamente;
15. Ajustar o gás com o fluxômetro em 100-200 mL/min e o vaporizador para 1,5-3%. Se o animal começar a despertar, gentilmente segure a máscara em sua boca/narinas até que fique completamente anestesiado novamente;
16. Monitorar a anestesia observando os parâmetros para monitoramento da anestesia contidos no item 1.7. Se os parâmetros estiverem corretos, principalmente se o animal não responder ao reflexo de retirada/interdigital, o procedimento pode ser iniciado. Se o animal responder ao reflexo, aumentar o vaporizador (dentro da faixa de 1,5% a 3%). Avaliar o animal diversas vezes durante o procedimento e ajustar o vaporizador conforme necessário;
17. Aplicar um lubrificante para olhos (solução fisiológica estéril, lágrimas artificiais, pomada oftálmica estéril ou óleo mineral estéril) no animal antes de iniciar o

procedimento, para evitar ressecamento da córnea e a consequente ceratite ou ulceração (o isoflurano inibe o reflexo de piscar);

18. Manter o animal aquecido durante o procedimento (por exemplo, bolsa de água quente, lâmpada aquecedora), para prevenir a hipotermia. Se possível, aferir a temperatura do animal durante e após o procedimento, conforme descrito no item 1.7;
19. Desligar o vaporizador ao término do procedimento e deixar o animal por alguns minutos somente no oxigênio, até que ele comece a despertar (cerca de 1 a 3 minutos);
20. Atentar para a recuperação do animal, conforme descrito no item 1.8;
21. Retirar o excedente de isoflurano, se houver, do aparelho de anestesia, recolhendo de volta ao frasco;
22. Desligar o suprimento de gás oxigênio;
23. Desconectar a mangueira de gás oxigênio do aparelho de anestesia inalatória;
24. Higienizar, com papel-toalha e álcool 70%, toda a superfície de trabalho, a máscara, a câmara de indução, a capela e o aparelho de anestesia inalatória. Se houver sangue, retirar primeiro com um pano umedecido e, depois, limpar com álcool 70%;
25. Desligar a lâmpada e o sistema de exaustão da capela.

3.14 Descrição dos planos anestésicos:

1. Observar os seguintes sinais para determinar o plano anestésico:
   a) Sedação: cauda e cabeça baixas; locomoção desacelerada e, posteriormente, ausência de movimentação, bem como diminuição e regularidade do padrão respiratório;
   b) Anestesia leve: perda do reflexo de endireitamento e presença de resposta a estímulos dolorosos;
   c) Anestesia cirúrgica: perda do reflexo de retirada de membros e pinçamento de cauda e espaço interdigital das patas; diminuição/ausência de tônus muscular dos membros; diminuição e padrão regular de frequência cardíaca e respiratória;
   d) Overdose: padrão respiratório profundo e irregular; presença de cianose (coloração azulada) nos coxins plantares, orelhas, cauda; ausência de resposta da pupila à luz; frequência cardíaca lenta e irregular.

3.15 Parâmetros para monitoramento da anestesia:

1. Profundidade e frequência respiratória:
   a) normal: ratos (70-115 movimentos respiratórios por minuto) e camundongos (94-163 movimentos respiratórios por minuto);
   b) observar a expansão da cavidade torácica;

c) observar a presença de secreções na porção posterior da garganta (um som semelhante ao gargarejo). Se isso ocorrer, limpar as vias aéreas com *swab*;

2. Frequência cardíaca:
   a) normal: ratos (250-450 batimentos por minuto) e camundongos (325-780 batimentos por minuto);
   b) sentir suavemente os lados do tórax com os dedos ou com o auxílio de um estetoscópio, para ter uma ideia da frequência cardíaca e de sua regularidade, pois é difícil contar os batimentos cardíacos em pequenos roedores.

3. Coloração de membranas mucosas:
   a) observar a coloração das gengivas (normal: rosadas; anormal: azulada);
   b) aferir o tempo de reperfusão capilar para ter uma ideia da pressão arterial: pressionar com o dedo a gengiva até que fique pálida, retirar o dedo e observar o tempo que leva para voltar à coloração que estava (normal: máximo 2 segundos).

4. Temperatura corporal:
   a) normal: ratos (37 $^{o}$C) e camundongos (37,5 $^{o}$C);
   b) verificar o parâmetro normal de temperatura utilizando termômetro digital com o sensor posicionado na mucosa retal;
   c) manter o animal aquecido durante e após a aplicação da anestesia, utilizando plástico-bolha (enrolar suavemente o animal de modo que, após voltar da anestesia, consiga se mover), lâmpada aquecedora (monitorar constantemente, para evitar hipertermia e/ou queimaduras) ou bolsa de água quente (monitorar constantemente, para evitar hipertermia e/ou queimaduras).

5. Reflexos (medição do grau de depressão do sistema nervoso):
   a) Reflexo de retirada/interdigital(*): estender um membro e usar os dedos para beliscar o espaço interdigital dos membros posteriores (mas não o dedo da pata em si). Se o animal puxar o membro, os músculos contraírem ou o animal vocalizar, não está suficientemente anestesiado. Falta de resposta indica anestesia profunda;

(*) Não tão eficácia com anestésicos inalatórios (pode desaparecer no plano leve de anestesia).

   b) Reflexo de pinçamento da cauda: usado para realizar o reflexo de retirada/interdigital em pequenos roedores de pata muito pequena;
   c) Reflexo palpebral (piscamento): tocar levemente a pele no canto medial do olho ou correr o dedo ao longo dos cílios Se o animal piscar ou mover as pálpebras, não está suficientemente anestesiado. Esse reflexo desaparece durante o plano leve de anestesia com isoflurano (desconsiderar a avaliação desse reflexo na realização de anestesia com cetamina);
   d) Reflexo anal: pinçar o esfíncter e observar a contração da musculatura ou sua

ausência (plano cirúrgico plano profundo de anestesia com isoflurano).

6. Outros parâmetros:
   a) Lacrimejamento: observar a redução da produção de lágrimas em estágios mais profundos de anestesia cirúrgica;
   b) Relaxamento muscular: observar a ausência do tônus muscular da mandíbula no plano cirúrgico de anestesia com isoflurano.

3.16 Recuperação da anestesia (o período vai variar de acordo com o grau de invasividade do procedimento realizado e a duração da anestesia):

1. Colocar o animal em uma gaiola individual com papel limpo e sem maravalha (para prevenir danos por aspiração ou morte);
2. Manter o animal aquecido (usando uma lâmpada de infravermelho, bolsa de água quente ou plástico-bolha);
3. Monitorar o animal até que fique consciente, sendo capaz de manter a postura corporal normal e realizar suas funções fisiológicas normais (beber água, comer, defecar etc.);
4. Após procedimentos cirúrgicos invasivos, se necessário repor as perdas hídricas (conforme item 1.9) e continuar com o protocolo analgésico indicado para o caso (deve ser iniciado antes da realização da cirurgia quando a anestesia é inalatória);
5. Facilitar o acesso do animal aos *pellets* de ração e ao bebedouro com água;
6. Colocar o animal de volta à sua gaiola original e retorná-lo à sala de animais;
7. Monitorar o animal nos dias subsequentes até quando for necessário quanto a peso, temperatura corporal, postura e comportamento indicativo de dor, ingestão de água e alimento, lambedura no local cirúrgico etc., avaliando a recuperação e determinando até quando administrar o analgésico de escolha.

3.17 Fluidoterapia:

1. Calcular a quantidade de fluido a ser reposta (aproximadamente 10 mL/kg/hora);
2. Administrar fluidos aquecidos (exemplo: solução salina estéril) por via subcutânea ou intraperitoneal. Se o animal já estiver totalmente consciente, administrar por via oral;
3. Estimar o grau de desidratação, monitorando o peso do animal antes e após o procedimento.

**Anexo 21. Procedimento Operacional Padronizado (POP)**

Título: Procedimentos de coleta de sangue via punção cardíaca em ratos
Número: FCF-IQ/USP/POP/BPE/3 Seção: 3.18 a 3.22
Elaboração:
Revisão:
Aprovado por:

Objetivo:
Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas por todo o pessoal (funcionários, pesquisadores e alunos) envolvido em atividades de coleta de sangue de ratos, via punção cardíaca, que necessitem ser executadas nas dependências da seção de experimentação do Biotério de Experimentação e Produção da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (BPE FCF-IQ/USP).

Aplicação:
Aplica-se ao conhecimento dos procedimentos de coleta de sangue via punção cardíaca em ratos da seção de experimentação do BPE da FCF-IQ/USP.

Siglas:
POP – Procedimento Operacional Padronizado

BPE – Biotério de Produção e Experimentação

3- Seção de experimentação

3.18 Utilização da técnica:

1- Uso da punção cardíaca como coleta de sangue terminal, realizada no animal sob anestesia profunda;
2- Realizada quando for necessário retirar grandes volumes de sangue (cerca de 10 mL de um rato de 150 g);
3- Utilizada na obtenção de amostra de sangue arterial e venoso (misto).

3.19 Procedimentos para anestesia profunda dos animais:

1- Contenção para a administração da anestesia injetável via intraperitoneal (IP):
   a- Apoiar a mão delicadamente sobre o dorso do animal e envolvê-la abaixo dos membros anteriores do animal. Se necessário, segurar os membros posteriores. Essa técnica pode ser realizada tanto dentro da gaiola como em cima da grade;

b- Executar o procedimento desejado (injeção IP) e liberar o animal em seguida, devolvendo-o para a gaiola.

3.20 Injeção intraperitoneal (IP):

1- Volume máximo por injeção: 5-10 mL (agulha 25 x 5.5 ou 25 x 6);
2- Segurar o animal como descrito no item 3.1, com a cabeça ligeiramente inclinada para baixo, para permitir que as vísceras se desloquem em direção ao diafragma e reduzir o risco de perfuração dos intestinos e do ceco;
3- Administrar a injeção no quadrante inferior esquerdo do abdome;
4- Introduzir a agulha fazendo um ângulo de 20° a 45° com a parede abdominal; caso a agulha seja muito comprida, introduzi-la apenas parcialmente;
5- Aspirar um pouco a seringa, antes de injetar a substância, para verificar se não atingiu a bexiga, os intestinos ou algum vaso;
6- Aplicar a injeção de anestésico.

3.21 Cálculo da anestesia:

1- Calcular a dose anestésica a ser administrada de acordo com os seguintes dados:
a-75 mg/kg cetamina + 10 mg/kg xilazina IP;
b-0,75 ml (75 mg) cetamina + 0,5 mL (10 mg) xilazina + 0,75 mL solução para injeção;
c- Obtém-se 4 a 5 doses de 0,2 mL/100 g.

3.22 Coleta de sangue via punção cardíaca:

1- Anestesiar o animal;
2- Verificar se não há reflexos, realizando o teste de sensibilidade a estímulos dolorosos, por meio do pinçamento das interdigitais e da cauda;
3- Posicionar o animal em decúbito dorsal;
4- Passar uma gaze embebida em álcool 70% por toda a extensão do tronco do animal; localizar o coração, posicionando o dedo polegar sobre o tórax, e deslizar o dedo sobre o osso esterno e a cartilagem xifoide, até o ponto onde não for mais possível sentir a cartilagem xifoide;
5- Introduzir a agulha perpendicularmente à parede torácica, em um ângulo de 45°, com uma leve inclinação para a esquerda;
6- Aplicar sucção leve para aspirar o sangue depois de ter penetrado o coração. A coleta deve ser lenta (o sangue é bombeado para a seringa, não sendo necessário puxar o êmbolo rapidamente);
7- Se no momento da sucção houver resistência e o sangue não aparecer, o bisel da agulha pode não estar no local correto. Nesse caso, mover lentamente a agulha para trás e tentar reposicioná-la.

**Anexo 22. SALA Nº:**

**PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

**1. Identificação do experimento**

1.1. Título do projeto:

_____

1.2 Finalidade acadêmica:

Pesquisa ( ) Ensino ( )

**2. Equipe**

Pesquisador responsável: _____
Aluno responsável: _____
Colaboradores: _____
_____
Unidade/bloco:_____
Ramal/USP:_____
Tel. emergência:_____
E-mail: _____

2.1 Qualificação da equipe quanto a experiência e treinamentos anteriores:

_____
_____

2.1.1 O pesquisador (alunos envolvidos) necessita de treinamento?

_____
_____

2.2 Período do experimento:

Início ____/___/_____ Término ____/___/____

2.3 Procedência dos animais:_____

2.4 Modelo animal:

( ) Rato ( ) Camundongo

2.5 Linhagem_____ Sexo ( ) Macho ( ) Fêmea
Nº de animais_____

**3. Procedimentos experimentais**

Jejum: ( ) Sim ( ) Não _____

Período de restrição_____

Restrição hídrica: ( ) Sim ( ) Não _____

Período de restrição_____

Imobilização do animal: ( ) Sim ( ) Não. Como_____

Ocorrerá lesão: ( ) Sim ( ) Não. Qual _____

Cirurgia: ( ) Sim ( ) Não _____

Anestesia: ( ) Sim ( ) Não. Qual _____

Recuperação pós-cirúrgica: ( ) Sim ( ) Não.
Justifique_____

Uso de analgésico: ( ) Sim ( ) Não.
Justifique_____

3.1 Envolverá dor intencional nos animais?
( ) Sim ( ) Não.
Justifique_____
_____

3.2 Exposição a agentes químicos/físicos/biológicos/mecânicos? Quais?
_____

3.3 Os materiais utilizados durante os procedimentos experimentais, bem como animais mortos, devem ser autoclavados (esterilizados previamente ao descarte)?
_____
_____

3.4 Haverá extração de fluidos? Especificar:
vias_____
Frequência de
amostras_____

Quantidade de
amostras_____

3.5 Qual é o método de eutanásia?
_____
_____

4. Há riscos para o funcionário ou pesquisador? Quais?
_____
_____

4.1 Outros comentários relevantes sobre o experimento:
_____
_____

**Anexo 23. COELHOS**

**PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

1. Identificação do experimento

1.1. Título do projeto:

_____
_____
_____

1.2 Finalidade acadêmica:
Pesquisa ( ) Ensino ( )

2. Equipe

Pesquisador responsável: _____
Aluno responsável: _____
Colaboradores: _____
_____
_____
_____
_____
Unidade/bloco:_____
Ramal USP:_____
Tel. emergência: _____
E-mail: _____

2.1 Período do experimento:

Início ____/___/_____ Término ____/___/____

2.2 Procedência dos animais:_____
2.3 Modelo animal: coelho
2.4 Raça_____ Sexo ( ) Macho ( ) Fêmea
Nº de animais_____

2.5 O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética e de Biossegurança da unidade?
Sim ( ) Não ( )

3. Procedimentos experimentais

3.1 Substância inoculada_____

Frequência/quantidade de amostras_____

4. Há riscos para o funcionário? Quais?

_____
_____
_____
_____

4.1. Outros comentários relevantes sobre o experimento e/ou agendamento de coletas de sangue e inoculações: _____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

## Anexo 24. AGENDAMENTO DE AULAS PRÁTICAS

Aluno(a):

Orientador(a):

Laboratório/departamento:

Projeto:

Número do protocolo da Ceua:

Telefone/ramal para contato:

E-mail:

Assinale abaixo as técnicas experimentais necessárias para treinamento, a ser agendado no Biotério de Produção e Experimentação (BPE):

- [ ] Manejo e contenção de camundongos
- [ ] Manejo e contenção de ratos
- [ ] Pesagem de camundongos
- [ ] Pesagem de ratos
- [ ] Via de inoculação em camundongos: vasos da cauda
- [ ] Via de inoculação em camundongos: plexo retro-orbital
- [ ] Via de inoculação em camundongos: intraperitoneal
- [ ] Via de inoculação em camundongos: intramuscular

- [ ] Via de inoculação em camundongos: oral por gavagem
- [ ] Via de inoculação em camundongos: subcutânea
- [ ] Via de inoculação em ratos: veia peniana
- [ ] Via de inoculação em ratos: vasos da cauda
- [ ] Via de inoculação em ratos: intraperitoneal
- [ ] Via de inoculação em ratos: intramuscular
- [ ] Via de inoculação em ratos: oral por gavagem
- [ ] Via de inoculação em ratos: subcutânea
- [ ] Via de coleta de sangue em camundongos: plexo submandibular
- [ ] Via de coleta de sangue em camundongos: intracardíaca
- [ ] Via de coleta de sangue em camundongos: vasos da cauda
- [ ] Via de coleta de sangue em ratos: intracardíaca
- [ ] Via de coleta de sangue em ratos: vasos da cauda
- [ ] Via de coleta de sangue em ratos: aorta abdominal
- [ ] Eutanásia de camundongos
- [ ] Eutanásia de ratos
- [ ] Anestesia injetável em camundongos
- [ ] Anestesia injetável em ratos
- [ ] Anestesia inalatória em camundongos
- [ ] Anestesia inalatória em ratos
- [ ] Utilização de gaioleiro metabólico
- [ ] Utilização de *rack* ventilado
- [ ] Utilização de fluxo laminar
- [ ] Boas práticas de higiene e segurança nas salas experimentais
- [ ] Noções de reprodução
- [ ] Fluxograma operacional no Biotério de Produção e Experimentação (BPE)
- [ ] Outros:

**Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**
Av. Prof. Lineu Prestes, 822
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo, SP
CEP: 05508-000
Tel.: 011 3091-3832 / 3091-3644
http://www.usp.br/bioterio