

Parte II – Protocolos e métodos de trabalho em doença de Chagas experimental

11. Cuidados especiais com animais no biotério de experimentação

Tania C. Araújo-Jorge
Solange L. de Castro
(Orgs.)

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

JORGE, TCA., and CASTRO, SL., orgs. *Doença de chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

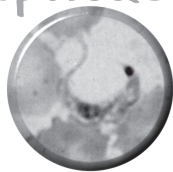


All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

Capítulo 11



Cuidados Especiais com Animais no Biotério de Experimentação

Tania C. Araújo-Jorge, Maria Teresa Rivera, Celia V. P. Cardoso & Sebastião E. R. Couto

11.1 A Ética na Experimentação Animal

O animal não é um tubo de ensaio. É um ser vivo que sente e sofre. Precisa, acima de tudo, ser tratado com respeito quando vai dar a vida e a saúde para fins de experimentação científica. E apenas o estritamente necessário deve ser feito com os animais.

Esses princípios gerais nem sempre são seguidos e por isso, no Brasil e internacionalmente, existe um movimento crescente pela ética na experimentação animal, que procura definir uma legislação para normatizar e regular esse uso, bem como criar comitês de ética apropriados para o acompanhamento, supervisão e controle do cumprimento dessas regras (ver legislação no Capítulo 20, Anexos).

O bem-estar dos animais de laboratório é essencial, tanto para os próprios animais quanto para a validade das pesquisas, já que animais cujos estados fisiológicos e psicológicos são desconhecidos, ou submetidos a estresse, tornam os resultados das pesquisas não confiáveis e as aplicações médicas deficientes. E qual é o primeiro passo para conseguirmos proporcionar este ambiente de bem-estar aos animais de experimentação? É, sem dúvida, a educação.

A falta de conhecimento, muito mais que a crueldade deliberada, é a principal causa do sofrimento animal. O conhecimento da biologia, fisiologia, hábitos e necessidades da espécie que estivermos criando e/ou experimentando faz com que saibamos como tratá-los e que tenhamos uma atitude de respeito e consideração para com os animais. Assim conseguimos evitar a apreensão e o medo proveniente de um mau manejo.

Devemos refletir sempre que estamos trabalhando com seres sensíveis. A rotina não deve nos fazer perder a sensibilidade. Pressupõe-se que qualquer pessoa que trabalhe com esses animais (desde o encarregado da higienização até o mais prestigiado pesquisador) tenha treinamento adequado.

Essa postura inicial norteia nossa perspectiva no uso de camundongos, que são o modelo mais comumente eleito para fins de infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*. No Anexo (Capítulo 20) incluímos os “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea), bem como versão do Anteprojeto de Lei que dispõe sobre a criação e o uso de animais para atividades de ensino e pesquisa e que está tramitando no Congresso Nacional. Cada vez mais as revistas especializadas exigem dos autores o compromisso moral e formal com essas normas éticas.

11.2 O Biotério de Experimentação

11.2.1 O ambiente

O animal de laboratório deve ser encarado para o experimento como um reagente biológico. Isso significa que tudo o que o circunda pode exercer influências diretas ou indiretas em suas características. A manutenção de condições ambientais estáveis está diretamente ligada à reprodutibilidade dos resultados obtidos no experimento.

O *local* de acondicionamento dos camundongos, classificados com padrão sanitário convencional, durante a experimentação deve ser *isolado* (sala ou biotério de experimentação). Nele devem ser mantidas constantes a *temperatura* (18 a 22°C) e a *umidade* (45 a 55%). São precisos, no mínimo, dois aparelhos de ar refrigerado, para serem ligados alternadamente dia e noite, sempre com o sistema de exaustão ligado para permitir troca de ar com o exterior. A *ventilação* (10 a 15 vezes/hora) deve ser adequada para a renovação regular do ar, trocas de calor e de produtos da respiração dos animais, remoção de poluentes, diluição de odores (principalmente a amônia) e dispersão das partículas bacterianas. Se possível o ar deve penetrar e sair por filtros, para que seja limpo, sem impurezas, poeiras e contaminantes.

Deve haver um *ciclo regular de luz* (claro/escuro), de preferência controlado por *timer* automático para 12/12 horas. Os camundongos têm hábitos noturnos (alimentação, acasalamento) e ficam em estado de sono, letargia e pouca atividade nos períodos de luz. Janelas ou vidraças devem ser evitadas na sala de experimentação porque dificultam o controle de claro/escuro e apresentam um espectro mais vermelho e menos violeta que eleva a carga térmica do ambiente.

Todos os tipos de estresse devem ser evitados. O ambiente deve ser calmo, *sem barulho* – principal causa de estresse dos animais. O maior perigo é representado pelos grandes ruídos, estampidos, ou barulhos cadenciados (ex.: martelar de pregos, ruído de centrífugas, impressoras, etc.). O ouvido humano não é um bom indicador para as condições de ruído dos animais, pois suas faixas de sensibilidade são muito diferentes. Sons agudos ou estridentes, de alta frequência, podem ser irritantes para os animais mas não para o experimentador. Já ruídos graves ou de baixa frequência podem passar despercebidos para os animais. As atividades de rotina da sala devem ser conduzidas com o mínimo de ruído possível. Outro fator importante de estresse é a manipulação dos animais por pessoas diferentes a cada dia, pois eles reconhecem e se acostumam com os indivíduos que se ocupam dos procedimentos de troca e manipulação regular. Além disso, quem lida com os animais de experimentação deve fazê-lo com cuidado e respeito. As pessoas têm odores próprios, que se somam aos odores de perfumes e desodorantes, que são reconhecidos pelos animais. Por isso, recomenda-se que toda manipulação com os animais seja feita sempre com o operador devidamente paramentado com guarda-pó, luvas, máscara e gorro para promover a sua proteção e segurança, além de diminuir o estresse dos animais com odores diversos.

O biotério de experimentação deve ter salas separadas por espécie hospedeira (camundongos, ratos, hamsters, etc.) e por agente patogênico (*T. cruzi*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, etc.).

11.2.2 A construção física

O biotério de experimentação deverá ser projetado em um ambiente mais isolado, dotado de *barreiras sanitárias*, impedindo a contaminação para os laboratórios, ou para o exterior.

Devem existir *outras barreiras seguras* na sala, para evitar a fuga de animais, ausência de ralos, piso, teto e paredes íntegras e protetores nas frestas das portas, que só devem abrir no sentido da área não contaminada para a contaminada (ver Capítulo 8).

11.2.3 Higienização

- a cada novo experimento toda a sala de experimentação deve ser esterilizada com vapores de formol, pelo menos por 48 horas, com o ambiente todo vedado ou limpo com solução desinfetante;
- pelo menos a cada quinze dias toda a sala (piso, paredes e estantes) deve ser limpa com solução desinfetante à base de amônia quaternária ou iodo (de acordo com a recomendação do fabricante, considerando-se ainda o agente patogênico).

11.2.4 Cuidados especiais

- deve haver uma sinalização da sala, ou demarcação da área de trabalho com *T. cruzi*, com aviso de ACESSO RESTRITO (ver Capítulo 8);
- o equipamento de proteção (cujo uso é *obrigatório*) deve estar acessível a quem for trabalhar com os animais (ver Capítulo 8);
- na parte anterior à porta de entrada da sala deve haver capacho para limpeza de sapatos;
- deve-se entrar no biotério sempre paramentado, inclusive usando calçados próprios ou sapatilhas descartáveis, para não introduzir no ambiente dos animais em experimentação microorganismos que circulam no laboratório e na rua;
- todos os materiais de trabalho devem estar bem guardados para evitar que acumulem poeira.

11.3 Solicitação e Acondicionamento dos Camundongos nas Gaiolas

11.3.1 Previsão da solicitação dos animais

O número de animais a ser utilizado no experimento deverá obedecer ao planejamento experimental (ver Capítulo 10), e sempre prever um percentual de mortalidade que seja o comum no modelo de trabalho escolhido.

Para infectar camundongos adultos, eles devem ter no mínimo oito semanas. Seu peso nessa idade variará segundo a linhagem de camundongo escolhida para o experimento. Animais isogênicos de oito semanas costumam corresponder a um peso de 18 a 20 g. Já para animais não isogênicos esse peso costuma ser de 22 a 24 g.

O pesquisador deve enviar uma previsão ao biotério de criação e produção, relacionando espécie, cepa, sexo, idade, quantidade e o período de uso dos animais.

Os animais devem ser solicitados ao biotério duas semanas antes do início do experimento (portanto duas semanas mais novos do que a idade planejada para a infecção), para serem acondicionados ao ambiente de experimentação.

Ao fazer o cálculo para solicitação de camundongos para o experimento deve-se levar em conta os seguintes dados:

Linhagem e sexo do camundongo a ser utilizado: _____

Grupos experimentais	G1	G2	G3	Gn	Total
<ul style="list-style-type: none"> • sexo • número de animais/grupo • data ideal de nascimento • peso (g) • data para chegada ao biotério de experimentação • data prevista para a infecção 					

11.3.2 Preparo das gaiolas para os camundongos

Sempre que possível deve-se autoclavar as gaiolas a 121°C por 30 min. Quando esse procedimento não for possível, as gaiolas devem ser limpas com detergente neutro e imersas em solução desinfetante à base de amônia quaternária ou iodo.

Os bebedouros e bicos devem passar pelo mesmo procedimento que as gaiolas, podendo-se usar um sonicador no caso dos bicos.

CUIDADO: verificar se a tampa veda bem a gaiola e se não existem espaços de fuga para os camundongos. Manter todo o material limpo, bem acondicionado e separado de acordo com a espécie.

11.3.3 Ração, água e maravalha

- **ração:** deve ser distribuída nos comedouros na quantidade necessária para uma semana, evitando-se assim a contaminação ambiental, sobretudo por fungos. Comumente é colocado um recipiente com tampa com o volume adequado para a demanda semanal de ração que será consumida pelo biotério de experimentação. A ração deve ser balanceada, sem pó e com prazo de validade para consumo. Um camundongo consome 10 g de ração e ingere aproximadamente de 4 a 5 g, por dia;

Obs: existem rações apropriadas para serem autoclavadas sem perda nutricional, especialmente vitaminas; se a *ração comum* for autoclavada, deve ser adicionado complemento vitamínico na água. Pode-se também esterilizar a ração por aquecimento em forno de microondas em recipiente compatível com esse procedimento.

- **água:** filtrada, clorada e acidulada (HCl, pH 3,0). Um camundongo bebe cerca de 5 ml de água por dia (3 a 7 ml) e excreta 1 a 3 ml de urina por dia. Os bebedouros devem ser trocados, pelo menos, uma vez por semana. É imprescindível verificar se os bicos permitem a saída da água, se não estão entupidos ou vazando;
- **maravalha:** deve ser de boa qualidade, sem pó ou pedaços de madeira, e acondicionada em saco plástico autoclavável (tipo *steril-pack*), saco de papel kraft ou saco de tecido de algodão para ser autoclavada em porções suficientes para as trocas periódicas (semanais ou a cada dois ou três dias, a depender do número de animais por gaiola).

Obs: toda e qualquer substância ou material envolvido no microambiente ou na alimentação dos animais deve ser submetido ao mais rigoroso controle de qualidade (físico, químico e microbiológico) de que se possa dispor.

11.3.4 Acondicionamento dos camundongos nas gaiolas

A separação dos animais nas gaiolas deve ser aleatória, colocando-se um animal de cada vez em cada uma das gaiolas previstas para o experimento. Nas gaiolas pequenas (20 x 30 x 12 cm) pode-se acondicionar até dez animais e nas grandes (30 x 45 x 12 cm) até vinte, nesse caso com mais de um bebedouro.

Os camundongos devem ser pesados, individualmente, para se obter grupos de animais com peso homogêneo.

11.3.5 Ficha de identificação da gaiola

As fichas de identificação das gaiolas devem ser preparadas antes do experimento (sobretudo antes da infecção) e devem conter: o número da gaiola, o experimento e seu responsável, dados acerca dos animais como cepa, sexo, idade, peso, número de animais e acompanhamento da mortalidade, e dados sobre a inoculação como parasito, cepa, via, número de parasitas. Cuidados especiais devem ser tomados quanto à manutenção dessas fichas nas gaiolas, evitando-se eventuais trocas ou extravio das mesmas. Recomenda-se o uso de um envelope plástico para proteção das fichas dos respingos de água e da penetração de poeira para permitir plena legibilidade. O Anexo (Capítulo 20) traz modelos para a confecção de fichas.

11.3.6 Esquema de troca das gaiolas

Deve-se trocar uma gaiola de cada vez, para se evitar a mistura das fichas de identificação. A troca deve ser regular e normalmente ocorre duas ou três vezes por semana.

Procedimentos

- preparo de gaiola limpa com maravalha autoclavada;
- transferência e contagem dos animais; conferência do número de animais da gaiola, com o número marcado na ficha de identificação;
- transferência da ficha de identificação da gaiola;
- transferência da tampa com comida e água (completar a ração e a água quando necessário);
- autoclavação das gaiolas sujas no estado em que se encontram;
- remoção completa da maravalha suja da gaiola, já autoclavada, para um saco de lixo apropriado;
- quando não for possível a autoclavagem das gaiolas sujas, todo o material sujo deve passar pelo procedimento de desinfecção química (ver Capítulo 8).

11.3.7 Identificação do camundongo: vista dorsal

A identificação individual dos animais permite que os dados obtidos possam ser correlacionados. Nos animais albinos, de pelagem branca, o mais simples é a marcação por pintura com solução aquosa de ácido pícrico saturada. Nos animais de pelagem colorida é necessária a marcação por cortes ou perfurações nas orelhas. No Anexo (Capítulo 20) há um exemplo de marcação dos animais com o esquema proposto pela OPAS. Na Tabela 1 indicamos o esquema por nós utilizado. No Anexo temos outros esquemas de identificação individual dos animais.

Tabela 1 – Esquema sugerido de marcação de animais

Número do animal	Pintura com ácido pícrico (camundongos brancos)	Perfurações ou chanfraduras das orelhas (camundongos brancos, pretos ou cinzas)
1	Linha crânio-dorsal	1 pique na orelha direita (OD)
2	Orelha direita (OD)	1 pique na orelha esquerda (OE)
3	Orelha esquerda (OE)	2 piques OD
4	Pata dianteira direita (PDD)	2 piques OE
5	Pata dianteira esquerda (PDE)	3 piques OD
6	Pata traseira direita (PTD)	3 piques OE
7	Pata traseira esquerda (PTE)	1 + 2
8	Dorso	1 + 4
9	Cauda, base	1 + 6
10	Todo branco	sem corte

Outros números: combinações dos nove primeiros, dois a dois ou três a três

11.3.8. Análise dos animais antes da infecção

Não basta apenas a solicitação dos animais. Outros detalhes são importantes antes do dia da infecção: pesagem e marcação prévia dos animais, coleta de sangue para análise do perfil hematológico e para a separação de plasma anterior à data da infecção, entre outros, que estão descritos com detalhes nos Capítulos 12 e 13, pois são procedimentos que garantem tanto o agrupamento de animais com características semelhantes como a obtenção de dados prévios à infecção, para posterior comparação.

11.4 Cuidados com a Biossegurança no Descarte de Carcaças

As normas de biossegurança referentes ao descarte das carcaças de animais infectados devem ser de conhecimento de todos os que circulam pelo biotério de experimentação (ver Capítulo 8). Destacamos:

- os animais mortos, infectados, NÃO devem ser descartados no lixo comum;
- após o sacrifício dos animais, colocá-los em sacos plásticos bem vedados e incinerá-los;
- se o incinerador localizar-se longe do biotério, ou da sala de experimentação, as carcaças devem ser autoclavadas, ou sofrer outro processo de esterilização, antes de serem levadas ao incinerador, para evitar qualquer contaminação no percurso;
- quando a incineração não for possível, proceder à autoclavação das carcaças ou abrir os animais, expondo todas as vísceras, e mergulhá-los em solução de formalina a 4% por, pelo menos, 12 horas. Selar em saco plástico para, somente então, desprezá-los no lixo comum;
- as gaiolas sujas dos animais devem ser autoclavadas ou imersas em solução desinfetante, por pelo menos 4 horas, e depois lavadas com detergente neutro e novamente esterilizadas ou desinfetadas. A maravalha usada deve ser ensacada e incinerada ou autoclavada, antes do descarte.

Atualmente utilizamos o seguinte o protocolo de descarte de carcaças de camundongos infectados:

- Os animais, após sangria ou dissecação, são formalizados (tratamento químico para desinfecção), colocados em sacos plásticos pretos (de lixo) e recobertos com formalina a 4%. O saco é vedado e levado ao recipiente de descarte de animais, localizado na capela de exaustão da sala central do departamento. Após 24 horas de contato com o formol, o saco com os animais pode ser descartado no lixo comum do prédio.

Referências Bibliográficas

- LUCA, R. R.; ALEXANDRE, S. R.; MARQUES, T.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J. L. B. & NEVES, S. P. *Manual para técnicos em bioterismo*. 1996. São Paulo: CB/USP.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *Manual para técnicos em animais de laboratório*. 1994. Rio de Janeiro: CPNEMB/DEBI/BM.
- POOLE, T. B. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animal*. 1986. Harlow, Essex: Longman, 6th edition.
- LANE-PETTER, W. & PEARSON, A. E. G. *The laboratory animal - principles and practice*. 1971. London, New York: Academic Press.