

Conceitos fundamentais em Ciência de Animais de Laboratório

Dia 05/05/2018 – 8 – 12 hs. Auditório Paulo Petrola – Prédio da Reitoria da UECE.

JOEL MAJEROWICZ. Médico Veterinário com Especialização em animais de laboratório (*Institute of Veterinary Medicine* - Berlin / Alemanha). Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Chefe do Laboratório de Experimentação Animal de Bio-Manguinhos /Fiocruz (1996 a 2007). Coordenador do “*Curso de Atualização Profissional em Biossegurança em Biotérios*” da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio / Fiocruz. Diretor do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) / Fiocruz (2009 a 2013). Assessor de Diretoria da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (2013 a 2017). Atual Consultor *Ad hoc* do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea). Atual Membro da Comissão Nacional de Bioética e Biossegurança do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Autor do livro *Boas Práticas em Biotérios e Biossegurança*, Ed, Interciência.

1- Introdução

Os seres vivos são, e deverão ser por muito tempo, a base das investigações biológicas. Sua importância na pesquisa científica, no desenvolvimento, produção e controle de vacinas e medicamentos, faz com que os animais de laboratório sejam imprescindíveis e de suma importância para a saúde humana e animal.



Os modelos animais, aqueles que possuem enfermidades similares ou idênticas as do homem, possibilitam inúmeras vantagens, sendo as mais importantes:

- **Conhecer a história natural da enfermidade, cuja etiologia, patogenia, sintomatologia e evolução podem manter-se em condições experimentais, sem a influência de fatores estranhos que a modifiquem;**
- **Reproduzir uma enfermidade, inúmeras vezes, em forma experimental, permitindo dispor de casuística suficiente;**
- **Desenvolver estudos fisiopatológicos e patológicos, que são difíceis ou inacessíveis em pessoa enferma;**
- **Utilizar meios terapêuticos, cuja aplicação na espécie humana se considera perigosa ou ainda não autorizada;**
- **Estudar fatores ambientais e genéticos que incidem na evolução da enfermidade;**
- **Estudar algumas enfermidades em raças e/ou linhagens de animais criadas para esse fim, abrindo-se um imenso campo de investigação.**

2- Ética

William M.S. Russel e Rex L. Burch definiram que a excelência técnica e o uso humanitário de animais de laboratório estão intrinsecamente ligados. No livro *The principles of Humane Experimental Technique* (Methuen, London, 1959), descrevem os 3 R's – *Reduction, Refinement e Replacement*. Reduzir, refinar e substituir o uso de animais são ações que foram discutidas nas últimas décadas e que nos dias de hoje são preconizadas, visando reduzir o número de animais em ensaios científicos, substituir o uso de animais sempre que possível e aprimorar métodos *in vivo* para minimizar o desconforto animal.

A diretriz brasileira de prática para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA) publicada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) apresenta os princípios de condutas que permitam garantir o cuidado e o manejo éticos de animais utilizados para fins científicos ou didáticos. A Diretriz ressalta as responsabilidades de todos que utilizam animais para:

- **Garantir que a utilização de animais seja justificada, levando em consideração os benefícios científicos ou educacionais e os potenciais efeitos sobre o bem-estar dos animais;**
- **Garantir que o bem-estar dos animais seja sempre considerado;**

- Promover o desenvolvimento e uso de técnicas que substituam o uso de animais em atividades científicas ou didáticas;
- Minimizar o número de animais utilizados em projetos ou protocolos;
- Refinar métodos e procedimentos a fim de evitar a dor ou a distresse de animais utilizados em atividades científicas ou didáticas.

3- Padrão de qualidade animal

3.1- Padrão Sanitário

Os modernos métodos de pesquisa envolvem sofisticados e sensíveis equipamentos, que demandam meticulosa validação, calibração e manutenção para assegurar a confiabilidade e reprodutibilidade dos experimentos. Nesse mesmo sentido, os animais devem possuir um padrão de qualidade, uma das razões pela qual devem ser criados ou mantidos em condições que minimizem a ocorrência de enfermidades; que seja garantido seu padrão genético e que sejam reduzidas as variações ambientais e nutricionais. Quando se consegue atender a essas condições, há um aumento significativo na confiabilidade dos resultados, diminui-se a necessidade de coleta de grandes quantidades de dados para análise estatística, reduz-se o tempo total da pesquisa e minimizam-se os custos.

Animais que são criados em biotérios, nos quais as condições sanitárias não são adequadas e que não possuem todas as barreiras sanitárias que impeçam a introdução de microrganismos, são referidos como “**convencionais**”. Esses animais possuem uma microbiota diversificada e que não é conhecida em sua totalidade. Estão sempre sujeitos a novas infecções. Os **livres de germes patogênicos específicos** (*specific pathogen free*-SPF ou heteroxênicos) são animais mantidos em biotérios que possuem eficientes barreiras sanitárias garantindo seu padrão microbiológico. Sua microbiota é controlada, de forma que alberguem somente agentes não patogênicos à espécie animal. Os **gnotobióticos** são aqueles mantidos em equipamentos, que os isolam completamente do meio ambiente. São subdivididos basicamente em **livres de germes** (axênicos ou *germ free*), os quais são isentos totalmente de microbiota e em **flora definida** que possuem apenas os germes ou parasitos propositadamente inoculados. Esse último, em função do número de agentes associados são divididos em monoaxênicos, dixênicos até polixênicos.

O controle sanitário periódico é a melhor forma de determinar o padrão sanitário dos animais e garantir a utilização de animais isentos microrganismos indesejáveis.

3.2- Padrão genético

3.2.1- Animais Heterogênicos

O principal objetivo na manutenção de uma colônia de animais **heterogênicos** (*outbred*, não consanguíneos, exocriados) é assegurar que a colônia permaneça constante em todas as suas características por tantas gerações quanto possível. O manejo reprodutivo requerido para produzir variações genéticas uniformes em uma população animal deve adotar um plano de acasalamento formal e reproduzível, eliminando uma fonte de erro devido a incerteza do grau de variabilidade genética que possa estar presente nessa população.

Para que uma colônia permaneça constante ela deve ser:

- Fechada, isto é, sem a introdução de reprodutores externos;
- Sem seleção para novas características, e
- Que tenha menos de 1% de índice de homozigose (*inbreeding*) por geração.

A escolha do sistema de acasalamento adequado é dependente do tamanho da colônia. Deve ser simples de maneira que seja realizado sem dificuldades e ainda que propicie um sistema de registros de fácil entendimento.

3.2.2- Animais isogênicos

Uma linhagem **isogênica** (*inbred*, consanguínea, endocriada) é aquela em que houve, pelo menos, 20 gerações de acasalamentos entre irmãos. Essas linhagens possuem em torno de 99% de genes em homozigose. Essas linhagens são originárias de um único casal e os subsequentes acasalamentos, entre irmãos, aumentam o índice de

homozigose a cada geração. Os registros das unidades de acasalamento ou de cada animal devem ser claros e precisos, de forma que se possa rastrear sua genealogia. Nesse sentido, as gaiolas devem possuir fichas que contenha todos os dados relevantes a origem da unidade reprodutiva ou dos animais individualmente. A colônia, como um todo, deve ser registrada em livro e/ou mapa genealógico. A seleção da unidade reprodutiva que dará prosseguimento a linhagem deve se basear, principalmente, na análise genética que se deve realizar a cada três gerações.

4- Macro e microambiente

Alojamento apropriado e a manutenção das condições ambientais são essenciais para o bem-estar animal, para a qualidade das pesquisas, e propiciar condições à saúde e segurança das pessoas envolvidas nessas atividades. Um bom ambiente propicia que os animais cresçam, reproduzam, mantenham um bom estado de saúde, tenham conforto e bem-estar e não seja um fator que afete o resultado de pesquisas. O microambiente para um animal é o ambiente físico mais próximo de si, a gaiola. O macroambiente é constituído pela área da edificação em que estão alojados.

4.1-Microambiente

Deve proporcionar condições para as necessidades comportamentais, fisiológicas, favorecer a manutenção da temperatura corporal, da movimentação e da postura normal da espécie animal. Deve propiciar aos animais, condições de se manterem limpos e secos, bem como proporcionar boa ventilação, espaço suficiente para movimentação com certa liberdade, acesso facilitado à água e a alimentação sólida.

As gaiolas devem ser construídas com materiais não tóxicos, de fácil higienização, desinfecção e/ou esterilização. Devem ser impermeáveis com superfícies sem ângulos fechados, sem cantos vivos ou bordas que possam acumular sujidades e dejetos animal. Os materiais de construção devem ser duráveis, resistentes à corrosão e que não propiciem pontos que possam traumatizar os animais e técnicos.

4.1.1- Alimentação sólida

As rações devem ser palatáveis, balanceadas nutricionalmente e sem contaminantes. O empacotamento, transporte, estocagem e manuseio devem ser de forma a minimizar a introdução de doenças, parasitos e vetores, como insetos e artrópodes, nas colônias de animais. Devem ser estocadas em depósitos apropriados e específicos, com boa ventilação e baixa umidade relativa. Os sacos devem ser armazenados em estrados afastados das paredes e piso. Os sacos abertos e não consumidos em sua totalidade, devem ser guardados em recipientes com tampa, para evitar a exposição a contaminantes. As rações autoclaváveis, devem ter seus níveis de nutrientes aumentados, pois durante o processo de esterilização há perdas, principalmente das vitaminas. O uso de irradiação, para esterilização de rações é recomendada.

4.1.2- Alimentação líquida

Água potável deve estar disponível aos animais *ad libitum*. A análise da água, quanto à qualidade microbiológica e contaminantes químicos deve ser efetuada periodicamente. O método de tratamento deve ser avaliado em função do experimento, pois a acidificação ou cloração da água, pode trazer alterações fisiológicas ou da microbiota animal. A filtração e a esterilização por autoclave, são os métodos mais empregados em biotérios. Os frascos bebedouros devem ser substituídos, pelo menos, uma vez por semana, para minimizar a proliferação de microrganismos.

4.1.3- Forração das gaiolas (“cama”)

A “cama” tem por objetivo manter os animais secos e limpos e proporcionar um ambiente confortável. O material mais comumente utilizado para a forração das gaiolas é a maravalha de madeira. A madeira utilizada para a produção de maravalha deve ser seca, isenta de contaminantes químicos e sua produção e armazenamento devem ser de forma a minimizar o acesso de roedores, insetos e outros animais que possam contaminá-la. A forração com sabugo de milho é de grande eficiência. Sua

excelente absorção de líquido possibilita um microambiente seco que contribui em diminuir o número de trocas de gaiolas por semana. No entanto, não produz um ambiente tão confortável quanto a maravalha.

4.2- Macroambiente

4.2.1- Temperatura

Para evitar uma grande variação de temperatura o sistema de condicionamento de ar deve possuir controle eficiente. Grandes variações de temperatura ao longo do dia é mais prejudicial que uma temperatura constante próxima a um dos extremos da faixa de tolerância. Os animais de laboratório, em sua maioria homeotérmicos, tentam manter a temperatura corporal constante. Mudanças na temperatura ambiental resultará em alterações compensatórias que afetaram o padrão metabólico, circulação, atividade e comportamento. Temperatura na faixa de 24+/-2°C é recomendada para a maioria dos roedores. Deve ser lembrado que a temperatura no interior das gaiolas, normalmente, é superior em alguns graus que a do ambiente e varia em função do volume da gaiola e números de animais alojados.

4.2.2- Ventilação

Os animais homeotérmicos mantêm um contínuo processo fisiológico envolvendo os líquidos corpóreos, nutrientes e oxigênio. Estão constantemente perdendo calor, umidade, dióxido de carbono, entre outros produtos metabólicos, que irão se acumular no ambiente, se a sala não possuir ventilação adequada. A ventilação tem por propósito suprir o ambiente com ar fresco, remover o calor produzido pelos animais, lâmpadas e equipamentos, diluir gases e partículas em suspensão e proporcionar, quando necessário, um gradiente de pressão diferencial entre ambientes. É preferível que o sistema de ventilação e exaustão mecânica use 100 % de ar exterior. O ambiente para a maioria dos roedores requer de 15 a 20 trocas de ar (volume do ambiente por hora), visando eliminar odores, gases e auxiliando a manter a temperatura e umidade do ambiente. Se a troca de ar é insuficiente, a densidade animal na sala deve ser reduzida e as gaiolas devem ser limpas com maior frequência, porém essa deve ser uma solução provisória.

4.2.3- Umidade relativa

A maioria dos animais de laboratório compensam o excesso de calor através do aumento do ritmo respiratório, contudo se o ar inspirado possui alto índice de umidade, afetará a capacidade do animal ajustar a temperatura corporal. A umidade relativa de 55+/-5% é recomendada para a grande maioria dos animais e a tolerância está na faixa de 30 a 70% UR. A umidade relativa no interior das gaiolas é em torno de 10% maior que no ambiente.

4.2.4- Luz

Animais, como os roedores, que são ativos ao entardecer e a noite, são sensíveis à luz com alta intensidade. A iluminação deve propiciar boa visibilidade e ser uniforme. Intensidade entre 250 e 500Lux à 76cm do piso do ambiente é recomendada para humanos em observação dos animais e anotações. Para muitas espécies animal esta intensidade de luz é desnecessária e no caso de roedores, desaconselhável. Intensidade de luz na ordem de 80Lux é adequada à reprodução e assegura um comportamento normal a maioria dos roedores. A regularidade do fotoperíodo também é importante para a manutenção da normalidade comportamental dos animais (sincronização do ciclo circadiano e ciclos reprodutivos). Recomenda-se 12/12 ou 10/14 horas de período de claro/escuro. A luminosidade nas salas dos animais deve possuir característica mais próxima possível da luz natural.

4.2.5- Ruído

Podem causar distúrbios nos animais e técnicos. Sons de alta intensidade ou súbitos são mais prejudiciais que os habituais e rotineiros. As instalações devem ser planejadas visando evitar a propagação de sons naturais, como de cães e primatas não humanos. De alta significância são os ruídos ultrassônicos, que os humanos não percebem, porém são percebidos por várias espécies animal (cães, camundongos e morcegos).