



AMBIENTE EM BIOTÉRIO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL E A ESPÉCIE *Rattus norvegicus*: REVISÃO

*ENVIRONMENT IN AN EXPERIMENTAL ANIMAL FACILITY AND THE SPECIES *Rattus norvegicus*: REVIEW*

Joice Lopes Cesarino, Jose A R Gontijo, Adriana Zapparoli*

Núcleo de Medicina Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP

*Autor para correspondência e-mail: adrianazapparoli@uol.com.br

Recebido em 15/12/2009, Aceito em 07/01/2011

RESUMO: Há tempos, o uso de animais com objetivos científicos é uma prática de investigação acadêmica. Para supri-la, surgiram os biotérios com padrões rigorosos, respeitando as normas éticas e as leis de manipulação e vivissecação. A necessidade de um padrão sanitário e ambiental conhecido exige um investimento pelas instituições nacionais na melhoria de seus biotérios. Por outro lado, a padronização microbiológica diminui o número de animais usados, pela redução das variações dentro e entre os grupos de testes, contribuindo para o bem-estar e a saúde dos animais de laboratório. O objetivo da atual revisão bibliográfica é abordar algumas das normas fundamentais de caracterização ambiental (micro e macroambientes) e de animais da espécie *Rattus norvegicus* albino macho. Ainda, salientar que para ser considerado um referencial em biotério de experimentação animal, é necessário que as instalações físicas e os equipamentos destinados aos animais de laboratório atendam requisitos mínimos de segurança, conforto e higiene; ao mesmo tempo, o pessoal técnico responsável pelo manejo dos animais deve obter qualificação e preparo para desenvolver as suas atividades nesse ambiente.

Palavras Chave: Biotério, *Rattus norvegicus*, Ambiente.

ABSTRACT: For some time, animals have been used for scientific purposes in the practice of academic investigations. To support this research need, animal houses or facilities were developed with rigorous standards, respecting ethical guidelines and laws for handling and vivisection. The need for recognized health and environmental standards requires an investment by national institutions in improving their animal facilities. On the other hand, microbiological standardization diminishes the number of animals used, by reducing the variations within and between the test groups, contributing to the well-being and health of the laboratory animals. The objective of this literature review was to examine some of the essential guidelines in the characterization of the environment (micro- and macroenvironments) and male albino rats of the species *Rattus norvegicus*. It should be pointed out that to be considered a reference animal facility in animal experimentation, it is necessary that physical installations and safety equipment meant for laboratory animals meet minimal safety, comfort and hygiene requirements; at the same time, the technical personnel responsible for the handling of animals should obtain the training and qualifications needed to carry out their duties in this environment.

Key Words: Animal facility, *Rattus norvegicus*, Environment.

HISTÓRICO

A experimentação animal data dos antigos Gregos e Romanos. Porém, foi durante os séculos dezoito e dezenove que houve o progresso de uma prática incomum para uma prática de caráter científico⁽¹⁾. Todavia, a partir do século vinte, intensificou-se o debate em torno das questões sobre a Ética na utilização animal. Porém, apesar de todos os esforços da comunidade científica a fim de reduzir e/ou substituir a sua aplicação, em pleno século vinte um, ainda não foi possível abandoná-lo. Assim sendo, a preocupação com o seu bem-estar levou a conscientização acadêmica sobre a necessidade do aperfeiçoamento na manutenção e no manuseio animal e da padronização de

alguns parâmetros, ditos básicos, mas extremamente necessários para a realização de um ensaio biológico de qualidade. O Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) elaborou uma série de princípios éticos, destacando-se o Art. 7º que postula: "os animais selecionados visando um experimento devem ser de espécie, de qualidade e de quantidade apropriados e não deixar de apresentar boas condições de saúde." Por outro lado, há vários anos tramita o projeto de lei 1153/95 no Congresso Nacional, amplamente discutido pela comunidade científica, contemplando aspectos exaustivamente discutidos pelos comitês de Ética, que visa o incentivo à aplicação do conceito 3 R's (*replacement*, *reduction* e

refinement) em experimentação animal, e com penalidades aos que não o cumprirem. Resumidamente, baseado no conceito supracitado, deve-se procurar substituir a utilização de animais em pesquisa por outros métodos, materiais e metodologias; reduzir o número de animais por meio de melhores delineamentos experimentais; refinar o protocolo experimental minimizando ao máximo o seu desconforto ou o seu sofrimento⁽²⁾.

Por outro lado, entre os animais disponíveis em biotérios brasileiros para estudo experimental voltados à saúde, encontra-se o rato pela facilidade de manutenção e manuseio, execução de procedimento técnico-científico, custo operacional, características filogenéticas e genéticas semelhantes à de seres humanos⁽³⁾.

CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE ***Rattus norvegicus***

O rato de laboratório, *Rattus*, deriva de colônias advindas dos Estados Unidos da América. Embora esse roedor seja originário da Ásia Central, a espécie acompanhou o homem em seu avanço e ocupação dos continentes, sendo encontrado hoje em dia em praticamente todas as latitudes. A taxonomia animal os mantém na Classe: Mammalia; Ordem: Rodentia; Família: Muridae; Gênero: *Rattus*. Embora o gênero compreenda 137 espécies duas delas surgem frequentemente em protocolos experimentais de pesquisa acadêmica: o

Rattus rattus (Rato Preto) e *Rattus norvegicus* (Rato doméstico marrom ou albino), sendo a última citada o objeto de caracterização aqui apresentado. Geralmente, esses roedores possuem um corpo fusiforme e uma calda que, em muitas linhagens, pode chegar a medir mais em comprimento do que o próprio corpo. Tanto as patas anteriores como as posteriores possuem cinco dedos. Não possuem glândulas sudoríparas e adaptam-se melhor ao frio. Não possuem vesícula biliar. São sociáveis e vivem em grupos estáveis. Porém, quando mantidos em isolamento sofrem comprometimentos fisiológicos e comportamentais. Dessa forma, a presença de outros membros os asseguram contra o estresse^(4,5). O rato nasce desprovido de pêlos, com exceção das vibrissas - essas responsáveis pelo tato - e com o corpo avermelhado; fechados os olhos e o pavilhão auricular que é aderido à cabeça; pesando entre 4g a 6g⁽⁶⁾. A puberdade se dá aos 30 dias e a maturidade sexual entre 50 e 60 dias. Em geral, o acasalamento ocorre nesse período quando os machos já pesam entre 200g a 250g. Quando adultos e saudáveis chegam a pesar de 500g a 600g. Por essas características anatômicas e comportamentais, a contenção física é considerada uma prática importante. Ela pode ser realizada pela base de sua cauda, desde que seja uma manobra rápida e sem causar desconforto ao animal, possibilitando erguê-lo delicadamente

pelo corpo e, imediatamente, colocando-se a mão firme e delicadamente sobre o dorso e sua caixa torácica para uma contenção segura⁽⁶⁾. Outro método utilizado para contenção de ratos, denominado "*Camilla's method*". Esse consiste em colocar o animal sobre um tecido ou toalha e cobrir a cabeça e o tórax (aproximadamente 1/3 do seu corpo) com a exposição da região posterior. Com uma das mãos, pressiona-se firme e gentilmente o tecido sobre o dorso do animal⁽⁷⁾. Porém, o método de contenção fica a critério do manipulador, o qual deve ser um excelente observador, atento a qualquer desconforto promovido. Para a identificação e controle do animal, quando em permanência em uma área de experimentação, é afixada em sua gaiola ou caixa uma etiqueta com diversos dados como a sua origem e a sua linhagem, se esse está em experimento ou em estoque, a sua data de nascimento e de entrada na área de pesquisa e o nome do pesquisador responsável seguido do número do protocolo experimental, previamente aprovado pelo Comitê de Ética e/ou de Biossegurança, de pesquisa animal da instituição. Essa prática visa a organização, o controle e a regulamentação das mais diferentes áreas de experimentação e do espaço do biotério^(8,9) segundo as normas atuais em Biossegurança e Bioética para uso consciente de animais em pesquisa.

CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL MÍNIMA NECESSÁRIA PARA MANUTENÇÃO DA ESPÉCIE *Rattus norvegicus* EM BIOTÉRIO

A caracterização do ambiente onde permanecem os ratos se divide em microambiente e macroambiente. O microambiente diz respeito ao espaço físico próximo ao animal, ou seja, a gaiola ou caixa. O macroambiente, por sua vez, refere-se ao ambiente físico secundário, como a sala, o hábitat externo⁽¹⁰⁾. Sabe-se que as condições do micro e macroambientes podem induzir a algumas mudanças nos processos metabólicos e fisiológicos, ou promover alterações e a suscetibilidade às doenças, dos animais⁽¹¹⁾. Assim, para um bom programa de gestão em biotério e/ou área de experimentação animal, inclui-se toda a instalação, o ambiente e o manuseio e manipulação do animal, além de idéias que permitam e favoreçam o animal ao crescimento, ao desenvolvimento, a reprodução, a boa saúde e ao bem-estar e, assim, minimizando-se as variações que possam afetar os resultados de um protocolo de pesquisa⁽¹²⁾. Dessa forma, todas as salas são ajustadas individualmente por parâmetros pré-estabelecidos na área de Bioclimatologia para essa espécie. Por exemplo, o fotoperíodo (ciclo de luz e escuridão) influencia o ritmo biológico do animal de hábitos noturnos. Períodos de luz de 12 - 14 horas/ 24 horas parecem ser os mais adequados à sua manutenção, mas a

iluminação deve atingir toda a área propiciando a regularização dos ciclos⁽¹⁴⁾. A intensidade e a frequência do som é outra variável controlada nesses ambientes^(10,15) e considera-se adequado os índices para ruídos ultra-sônicos (acima de 20 kHz) e frequências acima de 80 kHz⁽¹⁶⁾. Porque a ventilação é responsável pelo suprimento de oxigênio, pela remoção das massas de ar quente produzidas pela respiração e por luzes e equipamentos, pela diluição de possíveis contaminantes gasosos e particulados e, ainda, pelo ajuste do conteúdo de unidade do ar da sala, a sua recirculação é obviamente necessária; essa é considerada eficiente, quando um sistema é capaz de retirar os possíveis patógenos, geralmente, em suspensão naquele espaço. Aliada a sua renovação, deve-se prover ao ambiente uma filtração de ar eficaz com a finalidade de reter as partículas de poeira e os microrganismos. Para o animal de laboratório, a caixa ou gaiola é o seu hábitat e, para o bioterista ou pesquisador, ela possui a função de organizar um grupo de animais em estudo em um espaço delimitado, facilitando o manuseio, o controle e o cuidado⁽¹⁷⁾. De modo geral, são vastas as opções comerciais para aquisição desses receptáculos disponíveis atualmente. Normalmente, são caixas ou gaiolas com estruturas fortes facilmente substituíveis, superfícies internas regulares de fácil limpeza, resistentes à água quente, sabões, detergentes,

desinfetantes e outros agentes químicos; que permitem a permanência confortável dos animais, sem lhes fornecer oportunidades de fuga, facilitando as manobras pré-estabelecidas no protocolo de pesquisa e, ainda, de custo acessível e que produzem baixos níveis de ruídos quando em uso. Em média, recomenda-se o alojamento de quatro animais adultos por caixa⁽⁸⁾. Então, o piso deve ser coberto por uma camada de maravalha (raspa de madeira), preferencialmente de *pinus*, com a finalidade de absorver a urina dos animais e a água derramada proveniente dos bebedouros, eventualmente, em seu interior. A cama deve ser usada em quantidade suficiente para manter os animais secos no período estabelecido entre as suas trocas⁽¹⁸⁾. Outro fator considerado é o odor característico de identificação e de reconhecimento entre as espécies⁽⁸⁾. Porém, deve-se atentar a presença de poluentes atmosféricos encontrados em instalações animais como o gás amônia (NH₃). Esse é resultante da decomposição de resíduos nitrogenados, que provoca a irritação do epitélio respiratório e aumenta a susceptibilidade dos roedores à micoplasmose respiratória⁽¹⁹⁾. No entanto, desinfetantes, perfumes e desodorantes não devem ser usados para mascarar tais odores locais⁽²⁰⁾, mas preferir as boas práticas de higiene seguido ao fornecimento de ventilação adequada⁽¹⁰⁾. Como fonte de suprimento animal, a água potável deve estar

fartamente disponível, em todos os momentos e/ou de acordo com o protocolo experimental⁽¹⁷⁾. A sua troca freqüente é necessária para evitar que se transforme em meio de proliferação para microrganismos. A nutrição adequada constitui um importante fator de manutenção do animal. A ração balanceada deve ser oferecida de acordo com as necessidades diárias da espécie, diferentemente da água, nunca em quantidades excessivas, e evitando-se a deterioração do insumo em excesso presente na caixa.

Sobre a qualidade sanitária, a ocorrência de enfermidades em ratos de um biotério é minimizada por procedimentos de limpeza e desinfecção de interiores, como supracitado. Porém, um fator importante de associação a se considerar são os materiais biológicos utilizados nessas áreas somados a adoção de barreiras adequadas, visando sempre minimizar ao máximo os riscos de contaminação ambiental e/ou animal⁽¹²⁾. Atualmente, com base nas condições sanitárias, os animais se classificam em convencionais, livres de microrganismos patogênicos específicos (*specific pathogen free* - SPF), axênicos, gnotobióticos, animais com microbiota definida associada, animais mantidos em barreiras e, finalmente, animais monitorados⁽¹⁾, sendo considerados parâmetros necessários, os quais darão à confiabilidade aos resultados

experimentalmente obtidos na pesquisa científica.

CONCLUSÃO

O tema abordado caracteriza um fragmento da área da Ciência Animal de Laboratório, relacionado às normas de ambientação de interiores para sobrevivência da espécie *Rattus norvegicus* em área de experimentação animal, quanto à qualidade da pesquisa experimental e ao desenvolvimento para o enriquecimento ambiental. As instalações e alojamentos, como barreiras sanitárias, estantes ventiladas e caixas com ventilação individual, são consideradas fatores de desenvolvimento com o objetivo de melhorar os ambientes de criação, manejo e o bem-estar animal. A remoção de sujidades associada a uma boa desinfecção garante a saúde no biotério. Sendo assim, um conjunto de condições de higiene e limpeza, deve ser considerado como o principal fator de controle ambiental nesses espaços. Todavia, um grau elevado de bem-estar para os animais é alcançado também por meio da educação e do treinamento técnico especializado dos colaboradores da área. O desenvolvimento da ciência a favor do homem não pode servir de apoio para o uso indiscriminado e o desrespeito; é necessária uma postura ética e a adoção de medidas que diminuam o sofrimento animal.

REFERÊNCIAS

- 1- Balls M. Replacement of animal procedures. *Lab. Animals*. 1994; 28:193-211.
- 2- Balls M. The origins and early days of the Three Rs concept. *Altern. Lab. Anim.* 2009; 37(3):255-265.
- 3- Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critério de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta. Cir. Bras.* 2004; 19 (2):59-65.
- 4- Brown GM, Martin JB. Corticosterone, prolactin, and growth hormone responses to handling and new environment in the rat. *Psychosom. Med.* 1974; 36:241-247.
- 5- Latané B. Gregariousness and fear in laboratory rats. Fear and gregariousness in mice. *J. Exp. Soc. Psychol.* 1969;61-69.
- 6- Schossler JE. A escolha, contenção e manuseio de animais de experimentação. *Acta. Cir. Bras.* 1993; 8:166-168.
- 7- Rasmussem C, Ritskes-Hoitinga M. An alternative method for rat fixation when giving subcutaneous, intramuscular and intraperitoneal infection (Camilla's method). *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 1999; 26(3):156-159.
- 8- Kondo T, Ohno H, Kondo T, Shiimoto Y, Momii A. Development of dry skin in the NOA mouse under individual housing conditions: a potentially useful animal model for evaluating moisturizing effects. *Exp. Anim.* 2005; 54(5):429-36.
- 9- Dyke B. Basic Data Standards For Primate Colonies. *Amer. J. Primatol.* 1993; 29:125-143.
- 10-Hasegawa M, Kagiya S, Tajima M, Yoshida K, Minami Y, Kurosawa T. Evaluation of a forced-air-ventilated micro-isolation system for protection of mice against *Pasteurella pneumotropica*. *Exp. Anim.* 2003; 52(2):145-151.
- 11-Schoeb TR, Davidson MK, Lindsey JR. Intracage ammonia promotes growth of *Mycoplasma pulmonis* in the respiratory tract of rats. *Infect. Immun.* 1982; 38(1): 212-217.

- 12- FELASA Guidance paper for the accreditation of laboratory animal diagnostic laboratories. *Lab. Anim.* 1999; 33(1):19-66.
- 13- Gordon CJ. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol. Behav.* 1990; 47:963-991.
- 14- Serikawa T, Mashimo T, Takizawa A, Okajima R, Maedomari N, Kumafuji K, et al. National BioResource Project-Rat and related activities. *Exp. Anim.* 2009; 58 (4):333-341.
- 15- Jain M, Baldwin AL. Are laboratory animals stressed by their housing environment and are investigators aware that this stress can affect physiological. *Med. Hypotheses.* 2003; 60(2):284-289.
- 16- Heffner HE, Heffner RS. Hearing ranges of laboratory animals. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2007; 46(1):20-22.
- 17- Tober-Meyer BK, Bieniek, HJ, Kupke, IR. Studies on the hygiene of drinking water for laboratory animals. 2. Clinical and biochemical studies in rats and rabbits during long-term provision of acidified drinking water. *Lab. Anim.* 1981; 15:111-117.
- 18- Gibson SV, Besch-Williford C, Raisbeck MF, Wagner JE, McLaughlin RM. Organophosphate toxicity in rats associated with contaminated bedding. *Lab. Anim. Sci.* 1987; 37(6):789-791.
- 19- Easterbrook JD, Kaplan JB, Glass GE, Watson J, Klein SL. A survey of rodent-borne pathogens carried by wild-caught Norway rats: a potential threat to laboratory rodent colonies. *Lab. Anim.* 2008; 42(1): 92-98.
- 20- Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11(2):231-266.