

# RESBCAL

REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE  
CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Volume 2 - Número 1 - 2013

São Paulo - SP

*Publicação Semestral*



Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório  
C O B E A

ISSN 2238-1589

RESBCAL

São Paulo

v. 2

n. 1

p. 1-78

2013

© 2012 – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório  
Publicação trimestral/ Published four times to the year  
Tiragem/Print-run: 500  
Impresso no Brasil/Printed in Brazil  
Projeto Gráfico e Normalização: PoloPrinter  
Produção Gráfica e Impressão: PoloPrinter  
www.poloprinter.com.br

A RESBCAL – Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório é uma publicação científica trimestral voltada à Promover a educação e a atualização de profissionais que atuam na área da ciência de animais de laboratório. Divulga artigos de autores nacionais e estrangeiros, selecionados com base em critérios de originalidade e qualidade, em um processo de Double blind review.

#### **Direito Autoral**

As matérias assinadas são de total e exclusiva responsabilidade dos autores. Por meio do documento “Declaração de Originalidade e Cessão de Direitos autorais”, firmado quando da publicação de artigo, os autores declaram ser responsáveis por seu conteúdo, citações, referências e demais elementos que o compõem, bem como não existir impedimento algum, de qualquer natureza, para a sua divulgação. Declaram ser ele original, inédito e de sua autoria e autorizam sua reprodução, divulgação, distribuição, impressão, publicação e disponibilização, por parte da

RESBCAL, em mídias impressa e eletrônica ou em qualquer forma ou meio que exista ou venha a existir, nos termos da legislação vigente. A cessão de direitos autorais é feita a título não exclusivo e gratuito, abrangendo a totalidade do artigo, válida em quaisquer países, em língua portuguesa ou outra ou tradução, a critério da RESBCAL

#### **Permissão de Utilização**

É permitida a publicação de trechos e artigos, desde que citada a fonte. Todos os direitos desta edição são reservados a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL. Esta permissão de utilização inclui o direito de ler, copiar, distribuir, imprimir, pesquisar e estabelecer referências aos textos integrais da Revista.

#### **Filiação**

A RESBCAL é uma publicação da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

#### **Endereço**

Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório  
Rua Três de Maio, 100 – Biotério do INFAR – UNIFESP  
Vila Clementino  
São Paulo/SP – Brasil  
04044-020  
Telefone: 55 11 5576-4441  
E-mails: resbcal2011@gmail.com;  
sbcal2010.sbcal2011@gmail.com

**ISSN 2238-1589**

### **CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO**

Elaborada por Maria Cláudia Pestana CRB-8/6233

Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. – v. 2, n. 1 (2013)- . - São Paulo : SBCAL, 2012-

Trimestral  
ISSN: 2238-1589

1. Animais de laboratório. 2. Ciência dos Animais de Laboratório. I. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

CDD 619

O corpo editorial da Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (RESBCAL) tem a enorme satisfação de apresentar a todos os envolvidos na ciência de animais de laboratório o primeiro número do volume 2 da nossa publicação.

O principal objetivo desta revista é incentivar aos pesquisadores da ciência de animais em laboratório (incluindo, manipuladores, estudantes, técnicos e professores) a descreverem e compartilharem seus conhecimentos. Desta forma, acreditamos que o relato das experiências, durante a rotina de cuidados aos animais, possui a função de estimular o exercício de escrever um manuscrito e de promover a difusão de informações que estarão auxiliando seus pares em todo o país.

Neste número os leitores poderão informar-se sobre assuntos como o comportamento de camundongos, uma detalhada revisão sobre o uso de modelos animais para o estudo das principais cranioestenoses humanas. Também podem ser observados os resultados sobre o monitoramento ambiental e a eficácia de diferentes procedimentos para a higienização das mãos. Por fim, ressaltamos a iniciativa do desenvolvimento de um *software* livre para o gerenciamento de um biotério no Brasil.

Acreditamos estar iniciando um novo ciclo da RESBCAL. Estamos mantendo os princípios que motivaram a geração da revista e buscando aumentar a visibilidade e a acessibilidade da mesma para todos. Além da versão impressa, foi disponibilizada no site da SBCAL e no Portal de Revistas em Medicina Veterinária todos os artigos (na íntegra) do volume 1. Desde já, deixamos o convite para todos os interessados enviarem seus resultados no futuro para enriquecer a nossa publicação.

Gabriel Oliveira

## MEMÓRIAS

### **SBCAL/COBEA: 30 anos na defesa dos animais de laboratório**

*Gui Mi Ko, Rosália Regina de Luca, Sueli Blanes Damy, Vania Gomes de Moura Mattaraia e Gabriel Melo de Oliveira*

7-9

## ARTIGOS ORIGINAIS

### **Avaliação de diferentes técnicas de higienização das mãos para manipuladores de um biotério de criação e experimentação de camundongos**

*Danielle Cristina Gomes Chagas, Juliane Pereira Afonso, Luiz Pereira da Silva e Sandra Regina Alexandre*

10-19

### **Etograma de camundongos em biotério II: Quais são as principais diferenças no comportamento de Swiss Webster e BALB/c?**

*Frederico Villas Boas Rodrigues, Maria Alice Klouzel, Kelly Cristina Demarque, Janaína Alves Rangel, Luiz Cesar C. Pereira da Silva, Wanderson Silva Batista, Lucas dos Santos Gameiro e Gabriel Melo de Oliveira*

20-30

### **Monitoramento ambiental no biotério**

*Alzira Batista Cecílio e Elizangela Cristina de Paula Donato*

31-48

### **Estudo da hierarquia de camundongos Swiss Webster através do uso de Sistemas com Gaiolas Interligadas (SGI)**

*Maria Alice do Amaral Kuzel, Fernanda da Silva Oliveira, Kelly Cristina Demarque, Janaína Alves Rangel, Frederico Villas Boas Rodrigues, Wanderson Silva Batista, Lucas dos Santos Gameiro e Gabriel Melo de Oliveira*

49-60

## BREVE COMUNICAÇÃO

### **Desenvolvimento e implementação de um software livre para o gerenciamento de um biotério brasileiro**

*Giovanny Augusto Camacho Antevere Mazzarotto e Guilherme Ferreira Silveira*

61-68

## ARTIGO DE REVISÃO

### **Modelos animais das principais craniostenoses humanas**

*Wladimir Bocca Vieira de Rezende Pinto e Paulo Victor Sgobbi de Souza*

69-75

Linha de Mini Isoladores

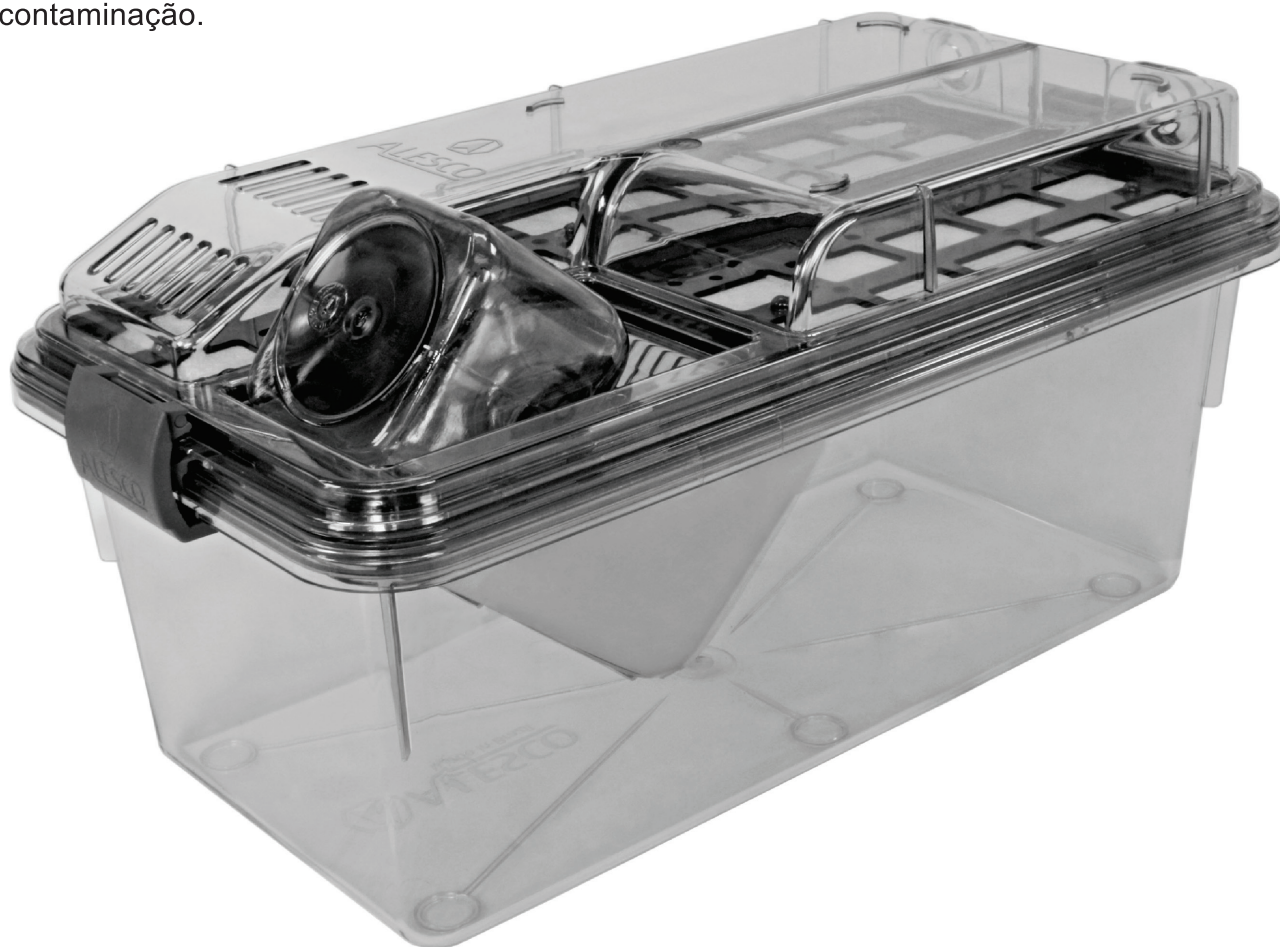
# DOMI

**A** linha **DOMI** é mais uma opção de Mini-Isolador para o pesquisador e completa o conjunto ALE Classic de consagrado sucesso.

Pensando em todos os detalhes, a nova tecnologia elimina problemas recorrentes em equipamentos com insuflação e exaustão de ar na parte superior do Mini-Isolador, como captação de pó, pedaços de maravalha, ração e pelos de animais, o que exige constante limpeza do equipamento e risco de contaminação.

Seu projeto inovador inclui um filtro sobre todo micro-ambiente, mantendo o sistema de ar do Rack isolado dos particulados gerados no mesmo.

Entre em contato com nosso departamento técnico para conhecer a melhor aplicação de cada modelo Alesco e suas diferenças.



**ALESCO INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.**

Rod. Monte Mor - Capivari, Km 17,5 - Sproesser  
Monte Mor/SP - Cep: 13.190-000 Caixa Postal: 137  
Tel: +55 19 3879 2037 Tel/Fax: +55 19 3879 2777  
Cel Fixo: +55 19 8232 5657 contato@alesco.ind.br

Imagens meramente ilustrativas

Curtia a Alesco  
no Facebook

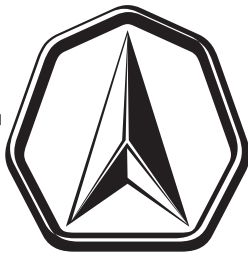


/empresa.alesco



**ALESCO**<sup>®</sup>

*Research for life.™*



# ALESCO<sup>®</sup>

*Research for life.<sup>™</sup>*

**Orgulho em ser uma empresa  
com DNA brasileiro!**

**Líder no mercado nacional.**

**Assistência técnica reconhecida  
e aprovada por todos!**

**Equipamentos modernos,  
sem a necessidade de  
limpeza e desmontagem.**

**20**  **anos**

# SBCAL/COBEA: 30 ANOS NA DEFESA DOS ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Gui Mi Ko<sup>1</sup>  
Rosália Regina de Luca<sup>2</sup>  
Sueli Blanes Damy<sup>3</sup>  
Vania Gomes de Moura Mattaraia<sup>4</sup>  
Gabriel Melo de Oliveira<sup>5</sup>

1 Universidade Federal de São Paulo  
2 Instituto de Ciências Biomédicas USP  
3 Faculdade de Medicina USP  
4 Instituto Butantan  
5 Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz

Autor para correspondência: Gui Mi Ko  
E-mail: guimiko.cedeme@gmail.com

Recebido para publicação: 03/09/2013  
Aceito para publicação: 04/09/2013

Os 30 anos de existência do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, atualmente chamada de Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) estão retratados neste artigo. Lutando contra as adversidades físicas das instituições e a falta de conscientização da comunidade científica sobre a necessidade de modelos biológicos adequados para o ensino e a pesquisa, o fundador, Prof. Dr. Fernando Sogorb Sanchis, e os 12 presidentes da Sociedade que o seguiram, conseguiram implantar uma dinâmica sempre atualizada de capacitação profissional, conceitos de bem estar animal através de cursos, congressos e seminários.

**Palavras-chave:** Animais de laboratório. Cursos.

RESUMO

## HISTÓRICO

Nascia em novembro de 1983 por iniciativa do fundador, Prof. Dr. Fernando Sogorb Sanchis, o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com objetivo de defender o bem estar animal e seu uso racional, capacitar profissionais e lutar por uma legislação específica. Contando inicialmente em seu quadro de sócios somente médicos veterinários tornou-se posteriormente multidisciplinar, após assembleia realizada na Reunião Científica Regional do *International Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS), ocorrida em Águas de Lindóia-SP, em 1986.

Em 2007, na XXII Reunião Científica da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE) em Lindóia, foi aprovado o novo estatuto do COBEA e, em 2008, na Assembleia Geral do

COBEA em São Paulo-Capital, houve a mudança de nome para SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, mantendo em sua sigla SBCAL/COBEA.

Nestes 30 anos de existência, a SBCAL/COBEA teve 13 presidentes (Tabela 1), realizou 9 Congressos e participou de 2 congressos internacionais, o primeiro em 1986 na cidade de Lindóia e o segundo em 1988 na cidade de Belo Horizonte (Tabela 2). A partir de 2002 foi incluída como sociedade integrante da FESBE. Em todos os eventos realizados foram ministrados cursos visando a capacitação de profissionais, com ênfase em fisiologia animal, genética, saúde, higiene, bem estar animal e outros.

No Congresso realizado em Foz de Iguaçu, em 2012, foi lançada a Revista da Sociedade Brasileira em Ciência de Animais de Laboratório (RESBCAL), na versão impressa e *online*, indexada no

**Tabela 1:** Períodos, presidentes e vice-presidentes do SBCAL/COBEA nos últimos 30 anos.

Período	Presidente	Vice-Presidente
1983-1988	Fernando Sogorb Sanchis	Jones Tadeu dos Santos Viana
1989-1990	Enio Cardillo Vieira	Sueli Diniz Lima
1991-1992	Tereza Kipnes	Hannah Rothschild
1993-1994	Ana Maria Aparecida Guaraldo	Silvia Maria Gomes Massironi
1995-1996	Antenor Andrade	Maria Lucia Barreto
1997-1998	Milton Oliveira Amado	Marilene Farias Alam
1999-2000	Luiz Edmundo Magalhães	Ana Maria Aparecida Guaraldo
2001-2002	Ekaterina A. B. Rivera	Benedito Luiz Figueiredo
2003-2004	Silvia Collete Barreto da Costa Ortiz	Joel Majerowicz
2005-2006	Silvia Collete Barreto da Costa Ortiz	Célia Cardoso
2007-2008	Marcel Frajblat	Ekaterina Rivera
2009-2010	Valderez Bastos ValeroLapchik	Ana Lúcia BrunialtiGodart
2011-2012	Vera Maria Peters	Ekaterina A.B. Rivera

**Tabela 2:** Congressos realizados por SBCAL/COBEA.

Ano	Cidade
1986	Águas de Lindóia*
1988	Belo Horizonte – MG**
1994	Guarujá – SP
1996	Rio de Janeiro – RJ
1998	Porto Alegre – RS
2000	Campinas – SP
2002	Goiania – GO
2004	Rio de Janeiro – RJ
2007	São Paulo – SP
2009	São Paulo – SP
2012	Foz do Iguaçu – PR

\* Assembléia Geral Extraordinária do COBEA em 21 de novembro de 1986, na Reunião Científica Regional do *Internacional Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS), no Hotel *Magestic*, em Águas de Lindóia – São Paulo.

\*\* Congresso Internacional de Gnotobiologia.

Guia VetIndex ([www.bvs-vet.org.br](http://www.bvs-vet.org.br)). Na Tabela 3 estão representados o número de artigos publicados por modalidade e instituições participantes, nos quatro primeiros fascículos do periódico.

Consta no Estatuto atual que a SBCAL/COBEA possui como objetivos programar e estimular pesquisas na área de experimentação com modelos animais; realizar reuniões, jornadas, congressos, simpósio e afins, destinados ao ensino, intercâmbio e difusão de conhecimentos e pesquisas na área de experimentação animal; promover cursos de aprimoramento e atualização em experimentação animal; proporcionar recursos materiais para estudo e pesquisas no campo de experimentação animal, pela celebração de convênios com entidades nacionais e estrangeiras; proporcionar informações científica e de cultura geral especializada a seus membros associados; assessorar e colaborar com entidades culturais, educacionais, técnicas e científicas de direito público ou privado nacionais e internacionais, que executem no seu todo ou em parte, pesquisa em experimentação animal.

Estamos convictos em afirmar que desde a criação da SBCAL/COBEA todas as diretorias e equipes esforçaram-se ao máximo para a evolução da ciência de animais de laboratório. Participações importantes, como na aprovação da Lei 11.794/2008 que estabeleceu os procedimentos



do uso científico de animais e na participação com representantes da SBCAL/COBEA no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

(CONCEA) demonstram o caráter atuante da nossa sociedade na busca pela proteção e o bem estar de animais de laboratório.

**Tabela 3:** Número de artigos publicados por modalidade e instituições participantes em 2012.

Nº de artigos	Modalidade	Instituição participante
04	Memórias	Centro Universitário Metodista IPA – RS
15	Artigos Originais	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) Faculdade de Ciências Farmacêutica da USP Faculdade de Medicina da USP
12	Breve comunicações	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP Fundação Oswaldo Cruz – RJ
08	Revisões	Hospital Universitário da USP Instituto Butantan – SP Instituto de Ciências Biomédicas da USP Instituto de Farmacologia da UNIFESP Instituto Oswaldo Cruz – RJ Institute Pasteur de Montevideo Instituto de Química da USP Qualitécnica Empresa Nacional de Serviços Ltda. Universidade de Campinas Universidade Federal de São Paulo Universidade Federal de Pernambuco Universidade Metodista de São Paulo

## SBCAL / COBEA: 30 YEARS IN DEFENSE OF LABORATORY ANIMALS

The 30-year-old Brazilian College of Animal Experimentation / Brazilian Society of Science in Laboratory Animals are portrayed in this article. Struggling against adversity physical institutions and lack of awareness of the scientific community on the need for adequate biological models for teaching and research, the founder, Prof. Dr. Fernando Sogorb Sanchis, and the 12 Society presidents who followed, succeeded in deploying a dynamic always updated professional training, concepts of animal welfare through courses, conferences and seminars.

**Keywords:** Laboratory animals. Courses.

**ABSTRACT**

# AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE HIGIENIZAÇÃO DAS MÃOS PARA MANIPULADORES DE UM BIOTÉRIO DE CRIAÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Danielle Cristina Gomes Chagas  
Juliane Pereira Afonso  
Luiz Pereira da Silva  
Sandra Regina Alexandre

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo quantificar, identificar e avaliar a carga microbiana veiculada pelas mãos de nossos manipuladores, bem como a correta utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs). Foram analisadas 188 amostras colhidas das mãos dos manipuladores durante o processo de troca dos microambientes dos camundongos nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Foram testados três diferentes métodos de lavagem e assepsia das mãos. Nossos dados indicam que a prática da lavagem das mãos com sabão bactericida e posterior desinfecção com álcool gel a 70% previne a disseminação de agentes promotores de surtos infecciosos em áreas de biotério. Outro fator relevante avaliado foi o tempo de utilização das luvas, não sendo recomendado o uso de um mesmo par por mais de 30 minutos.

Biotério de Criação e Experimentação,  
Departamento de Parasitologia, Instituto de  
Ciências Biomédicas/USP

Autor Correspondência:  
Sandra Regina Alexandre  
E-mail: sanreale@gmail.com

Recebido para publicação: 16/01/13  
Aceito para publicação: 25/04/13

**Palavras-chave:** Lavagem das mãos. Antissepsia. Controle de infecções.

## 1 HISTÓRICO

A preocupação com a necessidade de higienização das mãos na área da saúde iniciou-se no século XI, com Maimônides defendendo a lavagem das mãos pelos praticantes da medicina. Durante os séculos que se seguiram, os hábitos de higiene não passaram de rituais de purificação sem muita relevância. No entanto, a importância da transmissão de patógenos através das mãos foi demonstrada há mais de 150 anos por Ignaz F. Semmelweis, quando o mesmo produziu a primeira evidência de que a higienização das mãos poderia evitar a transmissão da febre puerperal<sup>1</sup>. Atualmente, apesar de todas as constatações quanto à eficácia da

higienização das mãos como método preventivo na disseminação de doenças, ainda nos deparamos com a dificuldade de sua implantação nas diversas áreas da saúde. No geral, os microrganismos são transmitidos por contato direto ou indireto por meio de gotículas de secreções respiratórias e pelo ar. É consenso que a transmissão de microrganismos por contato desempenha o papel mais importante na dinâmica das infecções<sup>2</sup>. A importância da higienização das mãos na prevenção de infecções é baseada na capacidade da pele em abrigar microrganismos e transferi-los de uma superfície a outra por contato direto ou contato indireto, por meio de objetos e insumos<sup>3,4,5</sup>.

A microbiota da pele é constituída por bactérias residentes e transitórias. A primeira formada por

microrganismos que se multiplicam e se mantêm em equilíbrio com as defesas do hospedeiro, sendo os mais comuns *Staphylococcus* coagulase negativo, micrococos e certas espécies de corinebactérias. Estes microrganismos apresentam alta resistência à remoção mecânica ou química. Contudo, a produção de calor, suor e a própria descamação das mãos, faz com que estes sejam removidos para as camadas mais superficiais da pele tornando-se assim capazes de se propagar por contato direto. A microbiota transitória, composta por microrganismos normalmente depositados na pele através de fontes externas, colonizam temporariamente os extratos córneos, sendo normalmente formada por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas esporuladas, fungos e vírus<sup>3,6,7</sup>.

A ciência de animais de laboratório vem sendo cada vez mais explorada, observando-se um aumento do uso de animais na pesquisa biomédica. Ou seja, nos biotérios o trabalho com animais de experimentação deve manter um elevado nível sanitário a fim de evitar infecções tanto no profissional de biotério, como nos animais<sup>8</sup>.

Considerando que o meio ambiente e os insumos não são os únicos veículos de infecções nas áreas de criação e experimentação animal, devemos voltar nosso olhar ao comportamento dos manipuladores, ao cuidado com a higiene pessoal e a adequada utilização dos EPIs, sendo este um fator intrínseco não menos importante que os citados anteriormente. Neste contexto, as mãos dos manipuladores de animais de laboratório apresentam grande importância na disseminação de patógenos nas áreas de criação, experimentação e manutenção animal<sup>2</sup>.

As transformações ocorridas nas últimas décadas na ciência de animais de laboratório têm levado os bioteristas a adotarem políticas educacionais quanto à prevenção e controle de infecções bem como a implantação de uma filosofia de educação contínua, viabilizando a atualização permanente de seus profissionais. Com a produção cada vez maior de linhagens de camundongos transgênicos e *knockout* e o avanço da pesquisa biomédica observa-se que mesmo com o declínio da prevalência de infecções, estas não estão

completamente eliminadas<sup>8</sup>. Portanto, o controle e a padronização de protocolos operacionais instituídos no manejo de animais de laboratório requerem um constante acompanhamento e avaliação. De maneira a detectar riscos intrínsecos e extrínsecos de contaminação, este monitoramento sugere melhorias e implantação de novas técnicas para conter a entrada de patógenos nas áreas de criação e manutenção animal perpetuando assim, colônias híbridas.

O presente estudo teve como objetivo quantificar, identificar e avaliar a carga microbiana veiculada pelas mãos de nossos manipuladores, bem como a correta utilização de EPIs de maneira a elaborarmos estratégias mais efetivas que minimizem a propagação de patógenos nas áreas de criação e manutenção de animais.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em um Biotério de Camundongos considerado integral quanto suas atividades, que compreendem a manutenção e criação de animais SPF crescendo-se àquelas de experimentação, mediante instalações e laboratórios adequados às pesquisas, bem como área de alojamento para animais inoculados, NB2 (CQB0046/98).

As amostras foram coletadas mediante termo de consentimento dos manipuladores, e aprovada pelos Comitês de Ética Animal e Humana do ICB/USP Protocolo N<sup>o</sup> 494/2011. Foram analisadas 188 amostras colhidas das mãos dos manipuladores durante o processo de troca dos microambientes dos camundongos (gaiolas) nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. A coleta foi efetuada seguindo o protocolo elaborado pelo biotério, no qual a técnica utilizada foi a de esfregaço de superfície através de *swab* estéril suavemente passado na palma das mãos por 15 vezes em sentidos opostos e entre os espaços interdigitais.

No **Grupo Controle (GC)** efetuou-se a avaliação da carga microbiana através do seguinte processo: Lavagem das mãos por tempo não deter-

minado, categorizado de acordo com a conduta de cada tratador, com água e sabão neutro, sem troca de luvas durante todo o procedimento de troca das gaiolas. Já nos grupos experimentais foram avaliados três diferentes protocolos:

**Método 1 (M1)** - Lavagem das mãos com água e sabão neutro, com tempo variando entre 1 a 2 minutos (orientação da técnica preconizada pela ANVISA)<sup>6</sup>; desinfecção com álcool gel 70% e troca das luvas a cada 60 minutos.

**Método 2 (M2)** - Lavagem das mãos com água e sabão neutro, com tempo variando entre 1 a 2 minutos; desinfecção com álcool gel 70% e troca das luvas a cada 30 minutos.

**Método 3 (M3)** - Lavagem das mãos com água e antibactericida, com tempo variando entre 1 a 2 minutos; desinfecção com álcool gel 70% e troca das luvas a cada 30 minutos.

Após coleta, as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio Müller-Hinton, pelo método quantitativo, identificadas e incubadas a 37°C por um período de 24 horas. Transcorrido o tempo de incubação, procedeu-se a leitura das placas, sendo o resultado expresso de acordo com a morfologia macroscópica das colônias (cor, dimensão, elevação e bordas) bem como pelo número de unidades formadoras de colônias/placa (UFC/Placa). As colônias com maior frequência de isolamento e semelhança morfológica macroscópica foram isoladas e identificadas pela coloração de Gram, em microscópio óptico. Os cocos Gram-positivos foram identificados pelo teste de produção de catalase. Os bacilos Gram-negativos foram identificados pelo teste EPM-Mili (Rugai). As diferentes cepas bacterianas de bacilos Gram-negativos foram submetidas ao teste de sensibilidade frente a antibióticos por meio de discos incubados em aero e anaerobiose à temperatura de 35°C e 42°C, respectivamente, para os seguintes antibióticos: Amicacina, Azetreonam, Cefepime, Cefoxitina, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Piperaciclina Tazobactan, Nitrofurontoina e Polimixina. O resultado dos testes de sensibilidade aos antibióticos permitiu a interpretação e categorização das bactérias frente aos mesmos compostos em sensível

(S) e resistentes (R), auxiliando na identificação fenotípica das colônias isoladas.

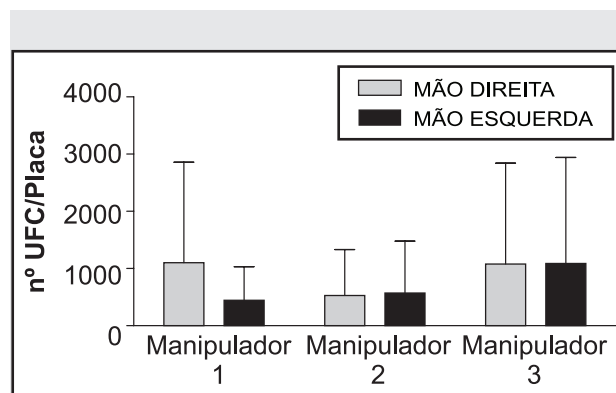
### 3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente no programa *GraphPad Prism*, utilizando o teste de variância (*One-Way ANOVA*) que permite detectar diferenças entre duas médias ou mais. Foi estabelecido o valor de 0,05 como nível de rejeição da hipótese de nulidade ( $p \leq 0.05$ ).

### 4 RESULTADOS

Inicialmente nossa avaliação foi comparar a média de UFC/placa, nos três manipuladores, entre as mãos esquerda e direita. Neste experimento não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (*ANOVA*  $p > 0,05$ ) nos quatro tempos analisados (Figura 1).

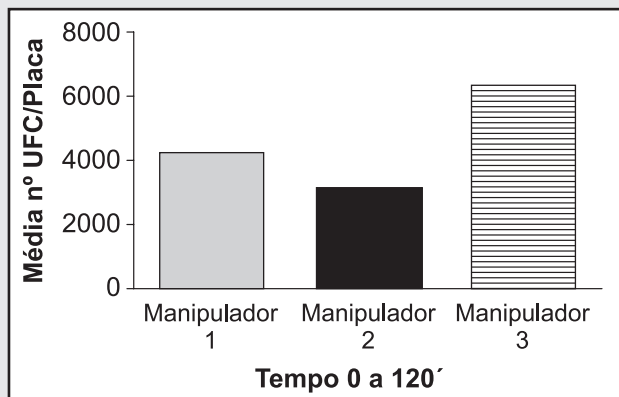
Na análise do grupo controle, onde não houve orientação prévia da técnica de lavagem das mãos, preconizada pela ANVISA, bem como a necessidade da utilização do álcool gel 70% em sua assepsia,



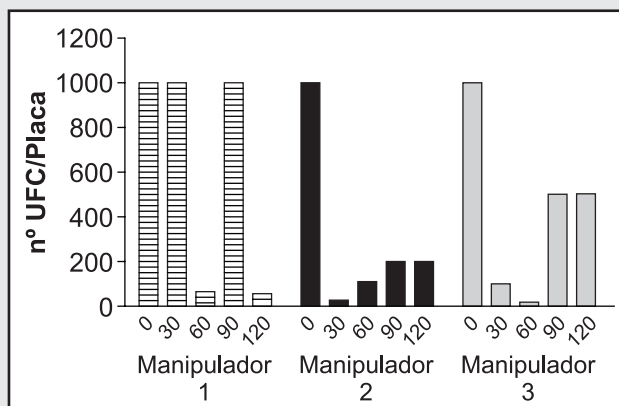
**Figura 1.** Médias de crescimento bacteriano, nas mãos direita e esquerda de cada manipulador.

observamos um crescimento bacteriano superior a  $2 \times 10^2$  UFC/placa para todos os manipuladores, em todos os tempos de coleta (Figura 2).

No método 1, após orientação da lavagem das mãos e da necessidade de utilização do álcool gel 70% como antisséptico antes da colocação das luvas, para assim dar início ao procedimento de trocas das gaiolas dos animais, observou-se significativa redução do número de UFC/placa quando comparado ao grupo controle (Figura 3), reduzindo em 95,0% a população bacteriana. Observou-se



**Figura 2.** Média de crescimento bacteriano entre os tempos 0 e 120 minutos para os três manipuladores no grupo controle.

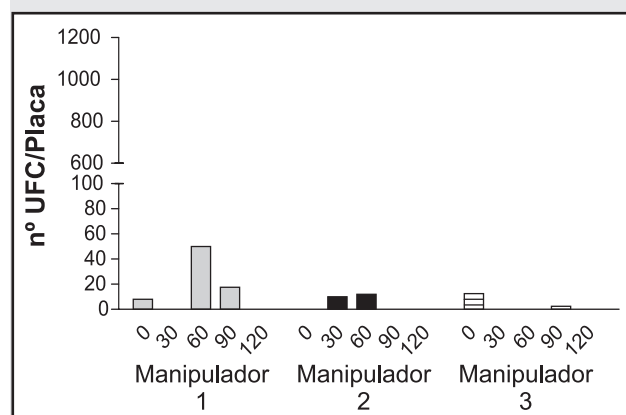


**Figura 3.** Número de UFC/Placa quantificados no Grupo Controle, sem orientação sobre a correta lavagem e assepsia das mãos.

que, decorridos 60 minutos do procedimento inicial de lavagem e assepsia das mãos os manipuladores 1 e 2 apresentaram aumento da microbiota de 0 para  $10^2$  UFC/placa. Na quarta coleta, realizada 90 minutos após o início da rotina de troca, apenas o tratador 1 não apresentou crescimento bacteriano; os demais manipuladores apresentaram crescimento inferior a 25 UFC/placa (Figura 4).

No Método 2 observou-se no ponto inicial que somente o manipulador 1 demonstrou crescimento bacteriano inferior a 50 UFC/Placa. Na coleta realizada após 30 minutos o manipulador 1 apresentou crescimento próximo a 100 UFC/placa enquanto que os demais manipuladores não apresentaram crescimento bacterianos em ambas as mãos. Na terceira coleta o manipulador 3 apresentou crescimento de 29 UFC/Placa enquanto que os outros manipuladores não observamos crescimento bacteriano. Na quarta coleta, realizada 90 minutos após a assepsia das mãos, quantificou-se a média de 56,33 UFC/placa para todos os manipuladores, não havendo crescimento bacteriano na coleta subsequente nas amostras coletadas dos três manipuladores, indicando que a metodologia aplicada continua sendo eficaz (Figura 5).

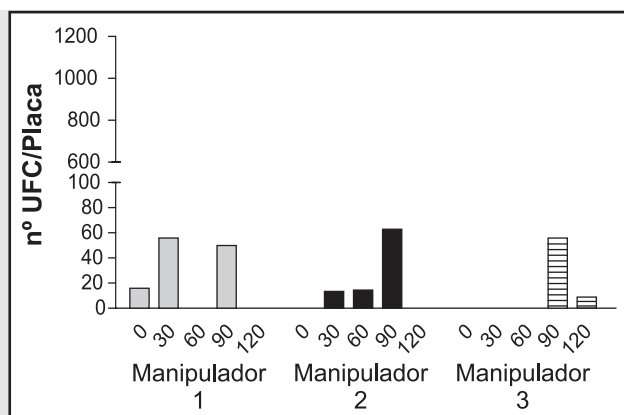
Na última etapa de nosso estudo Método 3, onde utilizamos um sabonete antibacteriano para



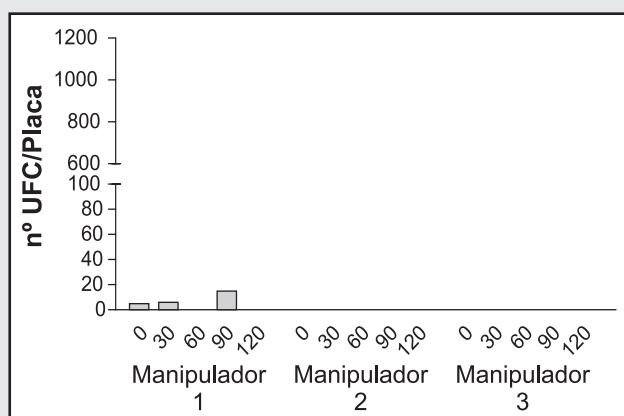
**Figura 4.** Crescimento Bacteriano, no Método 1 (Correta lavagem das mãos, desinfecção com álcool gel 70% e troca de luvas a cada 60 minutos).

a lavagem das mãos por um período de 1 a 2 minutos e, posterior desinfecção com álcool gel 70%, observamos em todas as amostras coletadas dos manipuladores um crescimento bacteriano médio de 2 UFC/placa entre os tempos 0 e 120 minutos (Figura 6).

Em uma análise mais representativa, vemos que a partir da orientação e treinamento dos manipuladores em relação à lavagem de mãos e o uso do álcool gel antes do início de suas atividades,



**Figura 5.** Crescimento Bacteriano, no Método 2 (Correta lavagem das mãos, desinfecção com álcool e troca de luvas a cada 30 minutos).



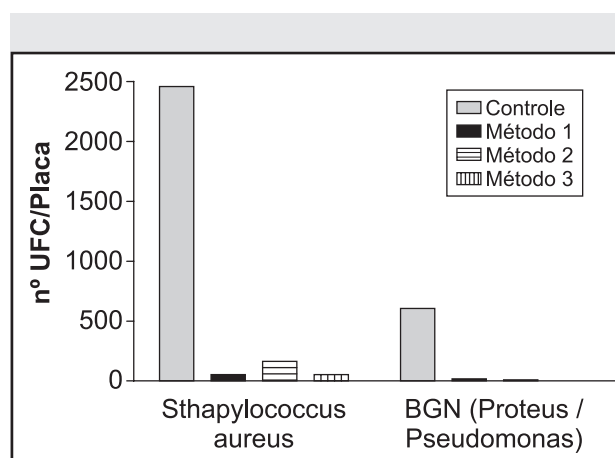
**Figura 6.** Crescimento Bacteriano, no Método 3 (Correta lavagem das mãos com sabão antisséptico, desinfecção com álcool gel e troca de luvas a cada 30 minutos).

ocorreu uma diminuição da carga microbiana em todos os profissionais envolvidos no trabalho.

Quanto à classificação bacteriana, os resultados foram expressos por sua morfologia, divididos em Bacilos Gram-negativos (BGN) identificados como: *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, Cocos Gram-positivos (CGP) identificados na sua maioria como *Staphylococcus aureus*, Bacilo Gram-positivo (BGP) não identificado e Leveduras apresentando maior incidência no Grupo Controle conforme Figura 7.

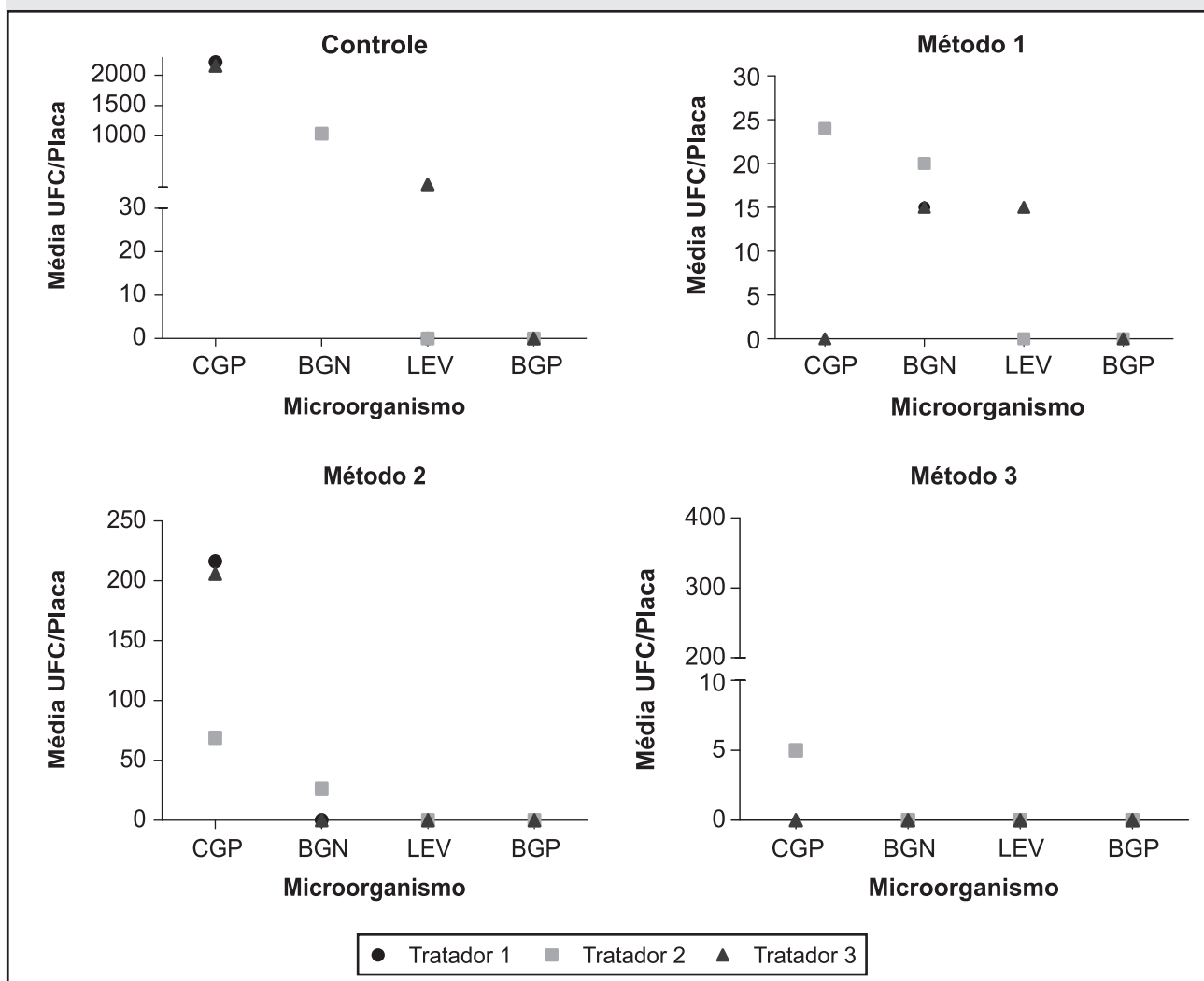
No Método 1 observou-se diminuição do número de colônias independente de sua morfologia para todos os manipuladores em média de 93,4%, observando-se de forma recrudescente nos métodos seguintes. Em repetição do protocolo 3, observamos crescimento escasso próximo a zero para todos os manipuladores conforme demonstrado no Quadro 1.

Seguidamente, realizamos o teste de sensibilidade destas bactérias, no intuito de avaliarmos o grau de resistência das cepas envolvidas nas mãos dos manipuladores conforme Tabela 1. Observamos que as cepas possuem semelhanças, porém tornam-se distintas quando observamos suas resistências intrínsecas que sabidamente influenciam na confirmação da identificação fenotípica<sup>17</sup>.



**Figura 7.** Identificação fenotípica e contagem de UFC/placa no Controle e nos Métodos Desenvolvidos.

**Quadro 1.** Crescimento de BGN, CGP, BGP E LEVEDURAS GRUPO CONTROLE, MÉTODOS 1, 2 E 3.



BGN=Bacilos Gram negativos CGP = cocos Gram positivos BGP = Bacilos Gram positivos LEV = leveduras.

Sendo importante ressaltar que em todas as cepas encontradas não detectamos nenhum tipo de resistência bacteriana importante, que comprometa futuramente o tratamento de uma possível infecção através de antibioticoterapia.

## 5 DISCUSSÃO

A etapa de troca do microambiente dos animais e o fornecimento de insumos foram identificados

como o ponto crítico para a entrada de patógenos, uma vez que nesta fase, ocorre o contato entre as mãos do tratador e os insumos fornecidos aos animais (água e ração).

As mãos são a principal via de transmissão de infecções cruzadas, tornando-se contaminadas no contato com fômites, equipamentos ou superfícies contaminadas<sup>9</sup>. A lavagem das mãos, é reconhecidamente a melhor medida na prevenção de infecções, entretanto, é realizada menos da metade das vezes em que seria indicada e, habitualmente efetuada com técnica incorreta,

**Tabela 1.** Sensibilidade aos antibióticos competentes aos micro-organismos encontrados nas mãos dos manipuladores.

<b>Antibiótico</b>	<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<b><i>Proteus spp.</i></b>
<b>Amicacina</b>	Sensível (38mm)	Sensível(15mm)
<b>Azetreonam</b>	Sensível(12 mm)	Sensível(20mm)
<b>Cefepime</b>	Sensível (25mm)	Sensível(20mm)
<b>Cefoxitina</b>	Resistente(0mm)*	Sensível(38mm)
<b>Ceftazidima</b>	Sensível(32mm)	Sensível(22mm)
<b>Ciprofloxacina</b>	Sensível(40mm)	Sensível(30mm)
<b>Gentamicina</b>	Sensível(35mm)	Sensível(30mm)
<b>Imipenem</b>	Sensível(40mm)	Sensível(30mm)
<b>Meropenem</b>	Sensível(20mm)	Sensível(25mm)
<b>Pip. Tazob.</b>	Sensível(20mm)	Sensível(32mm)
<b>Polimixina</b>	Sensível (12mm)	Resistente(0mm)*

\* Resistência Intrínseca.

principalmente no que se refere ao tempo de duração<sup>4</sup>. Diante do risco de infecção nas áreas de criação e manutenção animal, a higienização das mãos representa inquestionavelmente uma medida individual de prevenção simples e de baixo custo<sup>5,6,10,11</sup>.

Para a desinfecção das mãos, buscamos um produto com atividade germicida de amplo espectro mesmo na presença de matéria orgânica, mínimo tempo de inativação dos microrganismos, toxicidade “*in vivo*” nula ou mínima, tolerância às variações de temperatura e pH, presença de ação residual, odor agradável ou inodoro, facilidade de aquisição e preparo além de baixo custo, dentre outras qualidades<sup>6</sup>. Neste intuito, nossa escolha para a antissepsia foi o álcool gel a 70%. Esta escolha baseou-se não só na formulação como no baixo custo. Em relação à formulação, a consistência em gel aumenta o tempo de contato do álcool com a superfície e os microrganismos, retardando assim seu tempo de evaporação, quando comparado com a forma líquida<sup>1</sup>. Esta última apresenta menor tempo de contato, visto que o processo de

evaporação acontece de maneira mais rápida. Sua utilização vem sendo estabelecida como padrão mundial contra a transmissão de patógenos em ambientes nosocomiais<sup>12</sup>.

Sabe-se que a população microbiana das mãos varia de pessoa para pessoa e que são dependentes de determinados fatores como: dieta, condições sanitárias, poluição do ar e hábitos de higiene<sup>14</sup>. A dose infectante, ou número de unidades formadoras de colônias para a maioria dos microrganismos, capaz de induzir infecção ainda não esta estabelecida, mas sabe-se que quanto maior a carga microbiana, maior será o risco de contaminação/infecção<sup>13</sup>. A análise da média de colônias de micro-organismos detectados variou possivelmente pelo mecanismo de resistência que cada bactéria pode desenvolver frente ao desafio.

Com relação à avaliação quantitativa do número de bactérias presentes nas mãos dos manipuladores, observamos que quando estas se apresentam pesadamente contaminadas, principalmente por estafilococos, nem mesmo sucessivas lavagens ou fricções com diferentes antissépticos são sufi-



cientes para erradicar completamente os microrganismos, confirmando os resultados obtidos por Santos e colaboradores em 2007<sup>15</sup>.

A avaliação do grupo controle demonstrou que normalmente os micro-organismos reconhecem não só o ambiente como seus nutrientes, levando-os a se replicarem. Acredita-se que quando o ambiente apresenta-se rico em nutrientes o crescimento exponencial se dá em curto período, levando-o a sua replicação máxima entre 30 a 40 minutos, fase conhecida como exponencial de duplicação. Observamos que na análise realizada no tempo 60 minutos tivemos um declínio no número de colônias, provavelmente pela escassez de nutrientes, fase conhecida como estacionária onde o número de bactérias mortas é igual ao número de bactérias novas. Logo após este evento na coleta realizada aos 90 minutos observamos uma nova curva de crescimento bem delineada que acompanha uma nova população bacteriana.

Nossos dados indicam que a utilização do álcool gel a 70% na antisepsia de mãos, com tempo de contato entre 1 a 2 minutos antes da colocação das luvas, foi eficaz na redução das UFC. Segundo Mazzola (2006) a prática da lavagem das mãos com posterior desinfecção com álcool previne a disseminação de agentes promotores de surtos infecciosos em áreas de saúde<sup>16</sup>. Nesta medida, acreditamos que o álcool gel apresentou significativa importância na diminuição da população microbiana, agindo de forma antisséptica e reduzindo em aproximadamente 99,5% o crescimento de microrganismos.

Outro fator relevante avaliado foi o tempo de utilização das luvas, não sendo recomendado o uso de um mesmo par por mais de 30 minutos, pois além de aumentar as chances de perfuração, estas perdem sua capacidade de impermeabilidade, além de provocarem irritação da pele tanto pela sudorese, como pela multiplicação bacteriana, este fator se dá levando em consideração que este tempo de utilização das luvas promove a esfoliação da pele e com a sudorese estima-se a temperatura ideal para bactérias mesófilas e mesmo termófilas iniciarem o processo de replicação<sup>17</sup>. Preocupações econômicas tem assumido uma importância crescente

no controle de infecção, uma vez que a criação e manutenção de animais de alta qualidade sanitária e a diversidade de linhagens de camundongos transgênicos e *knockout* tem estimulado a pressão sobre a administração dos biotérios a investir pesadamente não só em equipamentos como autoclaves, estantes e racks ventiladas<sup>18,19</sup>. Além disto, devemos considerar que a higiene das mãos é uma das principais medidas no controle da transmissão bacteriana e que ainda ocorre a necessidade de um programa sistemático de pesquisa que permitirá o desenvolvimento de novos procedimentos, bem como o refinamento das abordagens existentes para a limpeza da mão.

## 6 CONCLUSÃO

O álcool gel a 70% como citado em outras literaturas mostrou-se eficiente na diminuição da carga microbiana em até 95% quando associado à correta lavagem das mãos<sup>1,2,20</sup>.

A necessidade de elaborarmos recomendações de treinamento e educação, como as da Sociedade Americana para Doenças Infecciosas (IDSA) na melhoria das práticas de controle de infecções e prevenção da transmissão de patógenos, influenciou de forma incisiva na redução microbiana veiculada por nossos manipuladores na criação animal.

A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) variou de pessoa para pessoa, de acordo com os parâmetros de idade, sexo, temperatura de cada sala, animais manipulados, costumes entre outros. Esta premissa pode ser observar na resistência, por parte do manipulador de número 3, em aderir aos procedimentos de assepsia empregados nos diferentes métodos analisados, onde por diversas vezes observamos um crescimento bacteriano aumentado quando comparado aos demais manipuladores. Isso certamente promoveu uma falha no processo e ressaltou a importância do treinamento e conscientização por parte dos trabalhadores no combate a infecções e promoção de medidas preventivas.

Quanto ao tempo de utilização das luvas para as atividades pertinentes ao biotério, observou-se que o tempo máximo de utilização não deve ultrapassar 30 minutos, pois além de aumentar as chances de perfuração e diminuição da capacidade de impermeabilidade ocorre um aumento na transpiração local, o que pode favorecer o aumento de UFC.

O método 3 demonstrou ser a melhor técnica devido aos três fatores analisados: 1) uso de sabão bactericida; 2) assepsia com álcool gel a 70%; 3) troca de luvas com intervalos de 30 minutos, repetindo a assepsia com álcool gel a 70% antes da colocação de um novo par.

Não observamos resistência bacteriana aos principais antibióticos utilizados na clínica médica e veterinária.

## EVALUATION OF DIFFERENT HAND HYGIENE TECHNIQUES FOR HANDLERS A LABORATORY ANIMALS HUSBANDRY

### ABSTRACT

This study aimed to quantify, identify and assess the microbial load conveyed by the hands of our handlers as well as the correct use of personal protective equipments (PPE). We analyzed 188 samples collected from the hands of handlers during the exchange of the mice microenvironments at 0, 30, 60, 90 and 120 minutes. We tested three different methods of washing and disinfecting the hands. Our results showed that the practice of hand washing with antibacterial soap, then alcohol 70% with subsequent disinfection with alcohol gel prevents the spread of infectious outbreaks in our facility. Another relevant factor evaluated was glove time using. We found that wearing the same pair of gloves for over 30 minutes is not recommended.

**Keywords:** Hand washing. Antiseptic. Infection control.

### REFERÊNCIAS

1. Andrade D, Beraldo CC, Watanabe E, Oliveira BA, Ito IY. Atividade antimicrobiana in vitro do álcool gel a 70% frente às bactérias hospitalares e da comunidade. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2007; 40(2): 250-4.
  2. Pittet D. Infection control and quality health care in the new millennium. *Am J Infect Control*. 2005; 33(5):258-67.
  3. Almeida RC, Kuaye AY, Serrano AM, Almeida PF. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. *Rev Saúde Pública*. 1995; 29(4):290-4.
  4. Lucet JC, Rigaud MP, Mentret F, Kassist N, Deblangy C, Andreumont A, Bouvet E: Hand contamination before and after different hand hygiene techniques: a randomized clinical Trial. *J Hosp Infect*. 2002; (50):276-80.
  5. McLaughlin AC, Walsh F. Self-reported reasons for hand hygiene in 3 groups of health care workers. *Am J Infect Control*. 2012; 40:653-8.
  6. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Higienização das mãos em serviços de saúde. Brasília: ANVISA; 2007. [citado 22 abr 2008]
  7. Mundy LM. Contamination, acquisition, and transmission of pathogens: implication for research and practice of infection control. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008; 29(7):590-2.
  8. Alexandre SR. Principais Ectoparasitos das Espécies Convencionais de Animais de Laboratório 2011. [citado 22 agosto 2011] Disponível em: <http://www.bioterios.com> .
- Disponível em: [http://anvisa.gov.br/hotsite/higienizacao\\_maos/manual\\_integra.pdf](http://anvisa.gov.br/hotsite/higienizacao_maos/manual_integra.pdf) .

9. Bjerke NB. The evolution: hand washing to hand hygiene guidance. *Crit Care Nurs Q.* 2004; 27(3): 295-307.
10. Boyce JM, Pittet D. Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations on the health-care infection control practices advisory committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA hand hygiene task force. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002; 23 (ss12):S3-S40.
11. Pittet D, Hugonnet S, Harbart S ET AL. Effectiveness of a hospital-wide program to improve compliance with hand hygiene. *Lancet.* 2000; 356:1307-13.
12. Kampf G, Kramer A. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clin Microbiol Rev.* 2004, 17: 863-893.
13. Oliveira DGM, de Souza PR, Watanebe E, Andrade D. Avaliação da higiene das mãos na perspectiva microbiológica. *Rev Panam Infectol.* 2010; 12(3):28-32.
14. Martins MJ. Tipos de microbiota, 2002. [citado em 12 abril 2013] Disponível em:  
[http://www.marcasaude.com.br/pdf/microbiologia/tipos\\_de\\_microbiota.pdf](http://www.marcasaude.com.br/pdf/microbiologia/tipos_de_microbiota.pdf)
15. Santos LR, Scalco Neto JF, Rizzo NN, Bastiani PV, Oliveira VM, Boscardin G, Rodrigues LB, Barcello HHA, Brum MV. Eficácia de desinfetantes e anti-sépticos empregados no hospital veterinário da UPF (HV-UPF) Brasil. *Rev FZVA Uruguaiana.* 2007; 14(2):156-64.
16. Mazzola Pg, Penna TCV, Martins MAS. Escolha do agente esterilizante/Desinfetante I – Concentração Inibitória mínima (CIM ou MIC) IN:NAROGATO SL & PENNA TCV. *Desinfecção e Esterilização.* São Paulo: Ed. Atheneu 2006. p.181-201.
17. Ferreira AM, Andrade D. Avaliação da segurança microbiológica das luvas de látex para procedimentos em uma unidade de terapia intensiva. *Esc. Anna Nery Enferm* 2008; 12(2):370-3.
18. Carissimi AS. Dimensionamento de equipamentos. IN:LAPCHIK VB, MATTARAIA VGM, KO GM. *Cuidados e manejo de animais de laboratório.* São Paulo:Ed Atheneu 2009. p.87-99.
19. Passos LAC. Tecnologias empregadas no alojamento de animais de laboratório. IN:LAPCHIK VB, MATTARAIA VGM, KO GM. *Cuidados e manejo de animais de laboratório.* São Paulo:Ed Atheneu 2009. p.113-34.
20. World Health Organization (WHO). Guidelines on hand hygiene in health care, 2005. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2005/pr50/en/>.

## ERRATA

O corpo editorial da Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, conforme requisitado pela autora Marilda Spinelli, vem por meio desta, comunicar a alteração no "Estudo comparativo dos valores hematológicos entre sexo e categorias sanitárias de camundongos C57BI/6 e BALB/c". Este artigo publicado no N1/V1 da respectiva revista na página 67, na tabela 2, onde se lê C57BI/6 pedimos a correção para a linguagem BALB/c para melhor compreensão dos resultados.

# ETOGRAMA DE CAMUNDONGOS EM BIOTÉRIO II: QUAIS SÃO AS PRINCIPAIS DIFERENÇAS NO COMPORTAMENTO DE SWISS WEBSTER E BALB/c?

Frederico Villas Boas Rodrigues<sup>1</sup>

Maria Alice Klouzel<sup>1</sup>

Kelly Cristina Demarque<sup>1</sup>

Janaína Alves Rangel<sup>1</sup>

Luiz Cesar C. Pereira da Silva<sup>2</sup>

Wanderson Silva Batista<sup>1</sup>

Lucas dos Santos Gameiro<sup>3</sup>

Gabriel Melo de Oliveira<sup>1</sup>

## RESUMO

O comportamento de camundongos em biotérios é uma importante área da ciência de animais de laboratório. Apesar de a literatura descrever inúmeros modelos de estudo comportamentais com diversas abordagens (depressão, ansiedade, agressividade e outros), estes modelos caracterizam-se por induzir o fenótipo comportamental desejado. Em nosso trabalho, buscamos determinar o padrão de comportamento sadio de camundongos desde o seu desmame até a idade adulta e comparar os dados entre duas linhagens: Swiss Webster e BALB/c. Baseamos nossa metodologia na observação de agrupamentos, mantendo suas interações, sem induzir ou interferir na dinâmica social. Estruturamos um etograma através das atividades prevalentes como: exploração do ambiente, busca por alimento, auto-higienização, contato físico e repouso. Quantificamos a incidência destas atividades demonstradas por cada indivíduo em seu agrupamento durante o período de 60 minutos. Nossos resultados demonstram que em ambas as linhagens há maior incidência de repouso em camundongos jovens e uma alteração no perfil no amadurecimento. A linhagem Swiss Webster prevalece a busca pelo alimento, seguida de exploração do ambiente. Na linhagem BALB/c há a prevalência da exploração do ambiente e do repouso. Além disso, a linhagem BALB/c apresenta baixa prevalência para auto-limpeza e alta para o contato físico quando comparada com a linhagem Swiss Webster. Outro ponto importante é que além da mudança do perfil de atividade durante as idades, cada agrupamento apresenta um perfil de incidência de atividades diferente, sendo peculiar a cada dinâmica do agrupamento. Desta maneira, podemos concluir que estes parâmetros são importantes para o estabelecimento de padrões sadios de comportamento.

**Palavras-chave:** Camundongos. Comportamento animal. Etograma.

1. Laboratório de Biologia Celular – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro;
2. Centro de Experimentação Animal – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro;
3. Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Biofilmes – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro.

Autor para correspondência:

Gabriel Melo de Oliveira

E-mail: gmoliveira@ioc.fiocruz.br

Recebido para publicação: 26 de abril de 2013

Aceito para publicação: 06 de junho de 2013

## 1 HISTÓRICO

O camundongo usado em biotérios é um mamífero da família *Muridae*, sub-família *Mu-*

*rinae*, da ordem *Rodentia* e gênero *Mus*. O seu nome científico é *Mus musculus*<sup>1,2</sup>. Apresenta um corpo fusiforme e flexível, permitindo a sua passagem em pequenos espaços. Seus pelos podem apresentar diversas colorações (da albina a

preta) são geralmente finos, retos e com padrão de distribuição uniforme por todo o corpo. Cauda e orelhas relativamente grandes permanecem descobertas de pelos durante toda a sua vida. O seu pequeno tamanho e sua área de superfície por grama de peso corpóreo relativamente grande suscetibilizam o animal às alterações das condições ambientais. A temperatura corporal (35,2 a 37,9°C) é facilmente afetada por pequenas oscilações modificando gravemente a fisiologia do animal. Também possui maior sensibilidade à perda de água e desidratação devido ao seu alto metabolismo (batimentos cardíacos: 500 a 780 bpm, em atividade; frequência respiratória de aproximadamente 163 por minuto) e ao mecanismo de regulação térmica. Sua expectativa de vida média é de dois anos, podendo chegar em alguns casos até quatro anos<sup>2,3</sup>.

A ciência de animais de laboratório é uma especialidade direcionada para o desenvolvimento de modelos experimentais pelo uso de animais de laboratório que promova conhecimento capaz de melhorar a qualidade de vida do ser humano e do próprio animal<sup>4</sup>. Dentro dessa modalidade, podemos descrever os ensaios pré-clínicos. Esse modelo experimental define-se por ensaios *in-vitro* (em laboratório) e *in-vivo* (em animais), que visam definir o perfil farmacológico e toxicológico de novos medicamentos. A farmacocinética não favorável, toxicidade do composto, eficácia não comprovada, aparecimento de efeitos adversos são os principais problemas detectados nos testes pré-clínicos e responsáveis pelo insucesso no desenvolvimento de medicamentos<sup>5,6,7,8</sup>. Segundo o OECD - *Guidelines for testing of chemicals*<sup>9</sup>, em relação aos ensaios de toxicidade aguda, após a administração do fármaco recomenda-se realizar uma criteriosa observação de sinais de intoxicação em pele e pelos, olhos e mucosas. Descreve também a observação de sinais alterados no sistema respiratório, circulatório e nervoso autônomo e central. Dentre alguns exemplos de alterações são destacados: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Ressaltamos que, segundo o respectivo manual, as alterações nos padrões comportamentais também devem ser

observadas, porém não especificam qual (quais) parâmetro(s) deve(m) ser(em) utilizado(s)<sup>9,10</sup>.

Na busca por esses parâmetros determinamos em camundongos machos da linhagem Swiss Webster agrupados na 3ª semana de vida as principais atividades individuais realizadas na gaiola durante sua interação social. Dentre elas destacamos: *EA*: exploração do ambiente; *PA*: procura de alimento; *AH*: auto-limpeza; *RE*: inatividade ou repouso e *Mo*: montagem ou ato de encostar-se um no outro. A partir da observação de diferentes agrupamentos determinamos a incidência dos tipos de atividade assim como a diferença da sua prevalência entre os grupos e as idades. Nossos resultados demonstraram que um número maior de animais recém desmamados (4ª semana de vida, ou seja infantes) mantiveram-se em repouso, principalmente dormindo. Conforme amadureceram a curiosidade demonstrada pela *EA* e a necessidade da busca pela alimentação, descrita pela atividade (*PA*), tornou-se mais prevalente entre os indivíduos dos grupos. A prevalência de *AH* foi relativamente constante para cada agrupamento e entre as idades. A *Mo* apresentou níveis muito reduzidos durante todo ensaio, porém constante. Outro importante fato a ser destacado foi que observamos diferença entre a incidência e atividades entre os agrupamentos e idades. Por exemplo, houve agrupamentos que apresentaram maior prevalência de animais dormindo com 4 semanas de vida do que os outros grupos, porém durante o amadurecimento modificou esse perfil, com maior incidência para *EA* e mesmo assim apresentando diferença para outros agrupamentos que apresentaram maior incidência de *PA*<sup>11</sup>. Desta forma, acreditamos que, apesar de serem da mesma espécie, camundongos da linhagem Swiss Webster (não isogênicos) e BALB/c (isogênicos) podem apresentar diferença da incidência/prevalência das respectivas atividades durante o seu amadurecimento.

Nosso objetivo nesse trabalho é qualificar/quantificar, através do etograma, as principais atividades individuais e sociais dos camundongos e comparar a incidência destas atividades entre as linhagens Swiss Webster e BALB/c. Além disso, sugerimos que estes resultados possam servir de

parâmetros para a avaliação comportamental de camundongos saudáveis e outros tipos de ensaios, principalmente pré-clínicos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

**Animais:** Camundongos das linhagens Swiss Webster ( $n=100$ ) e BALB/c ( $n=100$ ), machos e com três semanas de vida. Estes animais foram requisitados ao Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/Fiocruz) e mantidos no Setor de Experimentação Animal do Laboratório de Biologia Celular (SEA/LBC) do Instituto Oswaldo Cruz. A manutenção dos camundongos foi realizada de acordo com os parâmetros descritos no “Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório”<sup>12</sup> e sob a licença LW 5/12 da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA/Fiocruz).

**Agrupamento:** Os camundongos foram divididos, para cada linhagem, na terceira semana de idade, em grupos de até dez animais. Foram formados 10 grupos discriminados de A1 a A10. Estes animais foram identificados individualmente por um sistema de cor e posição corporal. Além disso, foi oferecido água e ração *ad libitum* para todos os agrupamentos. Todas as análises foram realizadas imediatamente após a troca da gaiola e maravalha (usada como piso).

**Etograma:** Estruturamos nossa análise comportamental pela avaliação dos principais atividades realizadas pelos camundongos nos seus respectivos agrupamentos. Podemos destacar qualitativamente as seguintes atividades: a) Exploração do ambiente (*EA*); esta atividade consiste no levantamento vertical com ou sem apoio das patas dianteiras na parede da gaiola; b) Procura de alimento (*PA*): determinamos esta atividade pela busca de alimento revirando a maravalha pelas patas dianteiras; c) Auto-higienização (*AH*): ato de o animal lambar-se ou limpar-se; d) Repouso ou descanso (*RE*): caracteriza-se pela atitude de deitar-se ou dormir durante a observação; e)

Montagem (*Mo*): esta atividade está relacionada a atitude de apoiar as patas dianteiras ou traseiras no dorso de outro animal.

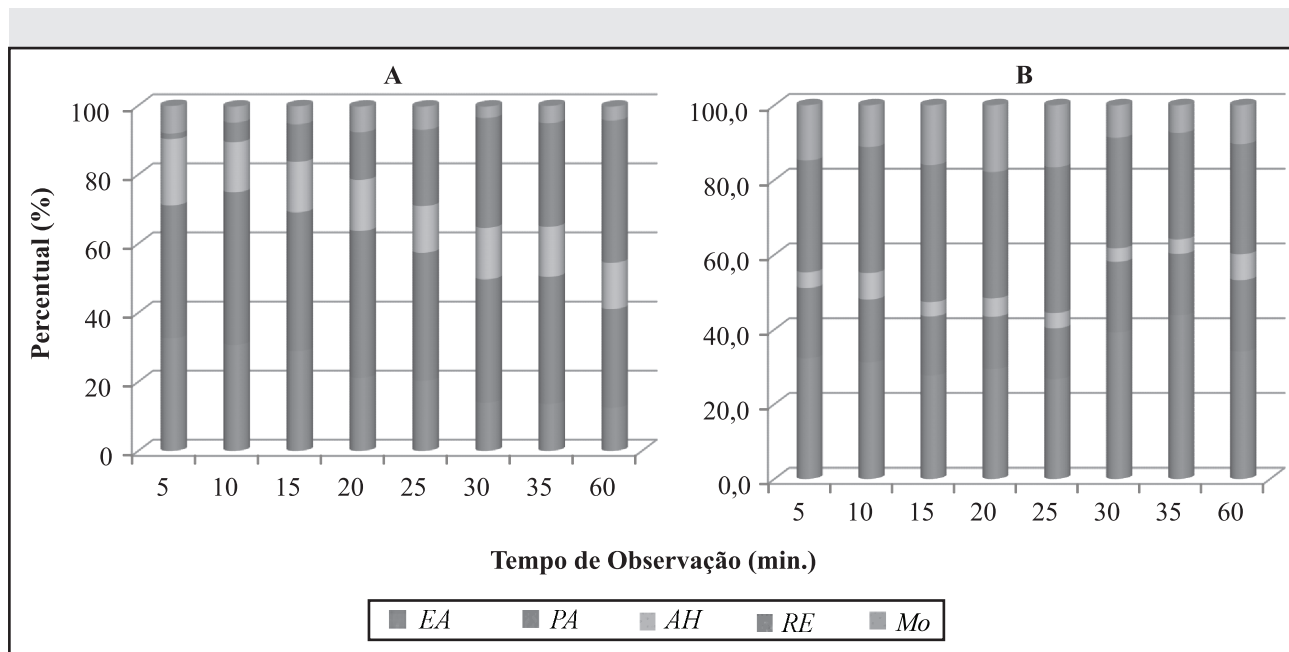
**Quantificação das atividades:** Uma vez a cada semana, entre a 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e a 8<sup>a</sup> semana de vida (sdv) realizamos a análise quantitativa através da filmagem de cada grupo (vista superior) com uma câmera Canon PowerShot SX20 IS® (Lake Success, NY - EUA) por 60 minutos contínuos. Após a captação do material, dividimos a filmagem de cada grupo em intervalos de 5 minutos e “congelamos” a imagem no respectivo intervalo. Nesta imagem fixada contamos o número de animais, para cada linhagem, estão demonstrando as respectivas atividades descritas no etograma. Desta maneira, conseguimos avaliar os seguintes dados: a) Dinâmica e tipificação das atitudes do animal durante o tempo de 60 minutos, desde a infância até a idade adulta; b) Prevalência dos tipos de atividade observada nos grupos de camundongos; c) Prevalência destas atividades em relação a idade; d) Diferença, entre cada agrupamento, do perfil prevalente de atividades. Além disso, comparamos os respectivos parâmetros entre as linhagens Swiss Webster e BALB/c durante 4, 6 e 8<sup>a</sup> semana de vida.

## 3 RESULTADOS

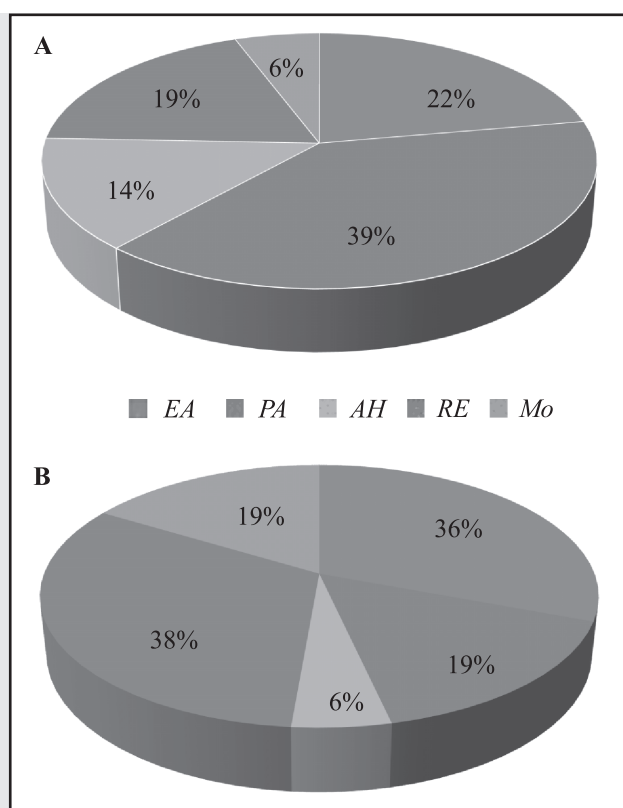
Nossos resultados demonstram diferença na incidência/prevalência de atividades entre as linhagens Swiss Webster e BALB/c. Na figura 1 avaliamos a incidência, em percentual, das principais atividades observadas nos camundongos de ambas as linhagens. Entre a 4<sup>a</sup> e a 8<sup>a</sup> semana de vida, avaliaram-se as principais atividades observadas nos camundongos de ambas as linhagens, revelando que na linhagem Swiss Webster (Fig. 1A) nos períodos iniciais da avaliação (5 a 15 minutos) demonstra maior prevalência dos animais procurando alimento (*PA*) com aproximadamente 40%. Cerca de 20% estão explorando o ambiente (*EA*) ou realizam a sua auto-higienização (*AH*);

1 a 10% estão em repouso (*RE*) e 5% estão em atitude de contato físico pela "montagem" de outro animal (*Mo*). Este perfil demonstra significativa mudança entre o 20º e o 35º minuto de observação. Em relação a *EA* encontramos uma variação decrescente de 20 a 15% da prevalência dos animais na realização desta atitude. Também observamos a queda entre 40 a 35% dos animais realizando na atitude de *PA*. A atitude de *RE* apresentou um aumento entre 10 a 30% do número de animais. Ao final, com 60 minutos de observação, observamos 13% dos animais em *EA*, aproximadamente 29% dos animais em *PA*; 13% em *AH*; 41% em *RE* e 4% em *Mo*. Na linhagem BALB/c observamos valores mais constantes para a incidência de atividades. Até aproximadamente a metade do tempo de observação (25 min) descrevemos a incidência das principais atividades em 30% para *EA*; 15% para *PA*; 5% para *AH*;

35% para *RE* e 15% para *Mo*. No período final da observação, entre 30 e 60 minutos, há o aumento da incidência da atividade *EA* (40%) e *PA* (20%) mantendo os níveis constantes de *AH* (5%); *RE* (15%) e *Mo* (5%). Os valores percentuais médios entre a 4ª e 8ª semana de vida também demonstrou diferença entre as linhagens (Fig. 2). Na linhagem Swiss Webster a *PA* é a atividade que é realizada por um maior número de animais quando estão em suas gaiolas em biotério, aproximadamente 39% dos animais estão envolvidos nesta atitude. Logo após, a *EA* está sendo realizada por 22% dos animais. A *AH* e o *RE* são realizadas por 19 e 14% dos animais, respectivamente. Apenas 6% dos animais são observados em atitude de *Mo*. Porém na linhagem BALB/c, aproximadamente 38% dos animais estão em repouso (*RE*) e 36% estão explorando o ambiente (*EA*). Os valores são iguais para os animais em *PA* e *Mo* por volta de



**Figura 1:** Tipificação da atividade de camundongos em relação ao tempo: A observação num período de 60 minutos possibilitou descrever a dinâmica das atividades em relação ao tempo. Na linhagem Swiss Webster (A) e BALB/c (B) quantificamos, em escala percentual (0 a 100%), a prevalência dos tipos de atividade exercida pelos camundongos. A exploração do ambiente (*EA*) a procura de alimentos (*PA*) a auto-higienização (*AH*) a atividade de repouso (*RE*) a atividade de montagem (*Mo*).



**Figura 2:** A incidência das atividades no agrupamento de camundongos: Nas duas linhagens, Swiss Webster (A) e BALB/c (B), após três semanas de observação, calculamos a média da incidência (em percentual – 0 a 100%) de atividades exercidas pelos animais. A procura de alimentos (*PA*) é a atividade de maior incidência, seguida da exploração do ambiente (*EA*). A auto-higienização (*AH*) e o repouso (*RE*) apresentam incidência semelhante. O contato físico, pela montagem (*Mo*) entre os indivíduos é a atividade de menor incidência.

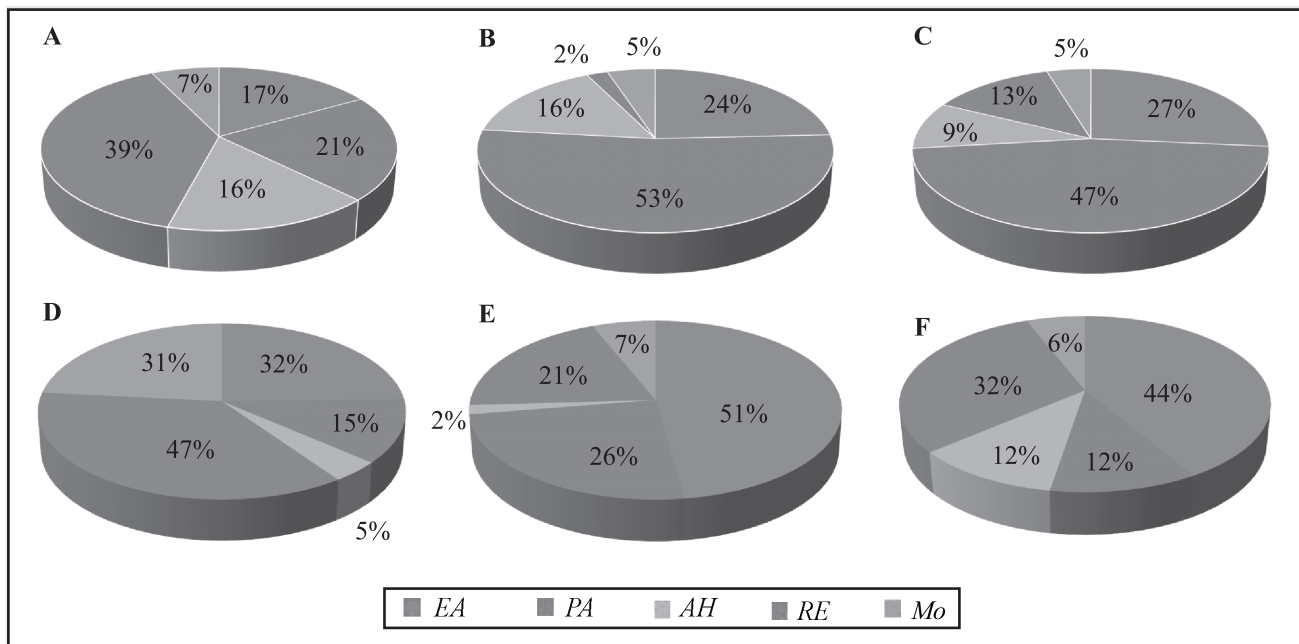
19% enquanto apenas 6% dos animais realizam a atividade de *AH*.

Avaliamos também a incidência das atividades durante o amadurecimento do animal (Fig. 3). Observamos na linhagem Swiss Webster que

os indivíduos com 4 semanas de vida (Fig. 3A) apresentaram maior prevalência de indivíduos em *RE* (39%); *PA* (21%); *EA* (17%); *AH* (16%) e *Mo* (7%). Este mesmo grupo de animais entre a 6ª (Fig. 3B) e a 8ª semanas de vida (Fig. 3C) apresentaram uma significativa alteração no seu perfil de atividade com maior prevalência de animais realizando as seguintes atitudes: *PA*: (6ª sdv, 53% e 8ª sdv, 47%); *EA*: (24 e 27%, respectivamente); *AH* (16 e 9%); *RE* (2 a 13%) e *Mo* 5% nas respectivas semanas. A linhagem BALB/c, na 4ª semana de vida (Fig. 3D), apresentaram maior prevalência de camundongos em *RE* (47%). Aproximadamente 32% dos indivíduos exploraram o ambiente (*EA*) e 31% estavam em *Mo*. Apenas 15% dos animais procuraram alimento (*PA*) e 6% demonstraram *AH*. Na 6ª semana de vida (Fig. 3E) há maior prevalência de *EA* (51%); com 26% para *PA*; 21% *RE* e apenas 7% em *Mo* e 2% para *AH*. Este perfil, novamente modifica-se na 8ª semana de vida (Fig. 3F). Cerca de 44% dos camundongos exploraram o ambiente (*EA*); 32% em *RE*; 12% para *PA* e *AH* e apenas 6% para *Mo*.

Além da avaliação por idade, também realizamos a avaliação entre três agrupamentos diferentes para as linhagens Swiss Webster (Fig. 4) e BALB/c (Fig. 5). Na linhagem Swiss Webster, entre as idades (4ª sdv: 4A a C; 6ª sdv: 4D a F e 8ª sdv: 4G a I) há a similaridade do perfil onde observamos maior prevalência de animais em *RE* na 4ª semana de vida e conforme o amadurecimento há uma alteração prevalecendo a *PA* e *EA*. Ressalta-se que o Agrupamento 3 (A3) demonstrou um perfil constante em todas as idades, prevalecendo *PA* e *EA* desde a 4ª semana de vida. Então em relação aos agrupamentos (A1: 4A a G; A2: 4B e H; A3: 4C e I) podemos observar que cada um destes apresenta perfis de atividades semelhantes com prevalência de *PA* e *EA*, porém a o número de animais exercendo estas atividades é diferente entre cada agrupamento. Na linhagem BALB/c, o agrupamento A3 (5C a I) apresentou diferença no perfil de atividade em relação aos outros agrupamentos (A1: 5A a G; A2: 5B a H). Há um maior número de camundongos em repouso (*RE*) e menor número de animais em *EA*. Também em





**Figura 3:** Incidência de atividades em relação a idade: Estes resultados demonstram, para ambas as linhagens Swiss Webster (A, B e C) e BALB/c (D, E e F) que as atividades exploração do ambiente (EA), procura de alimentos (PA), auto-higienização (AH), repouso (RE) e (Mo) apresentam diferentes percentuais de incidência de tipos de atividade em relação a 4ª (A e D), 6ª (B e E) e 8ª (C e F) de vida.

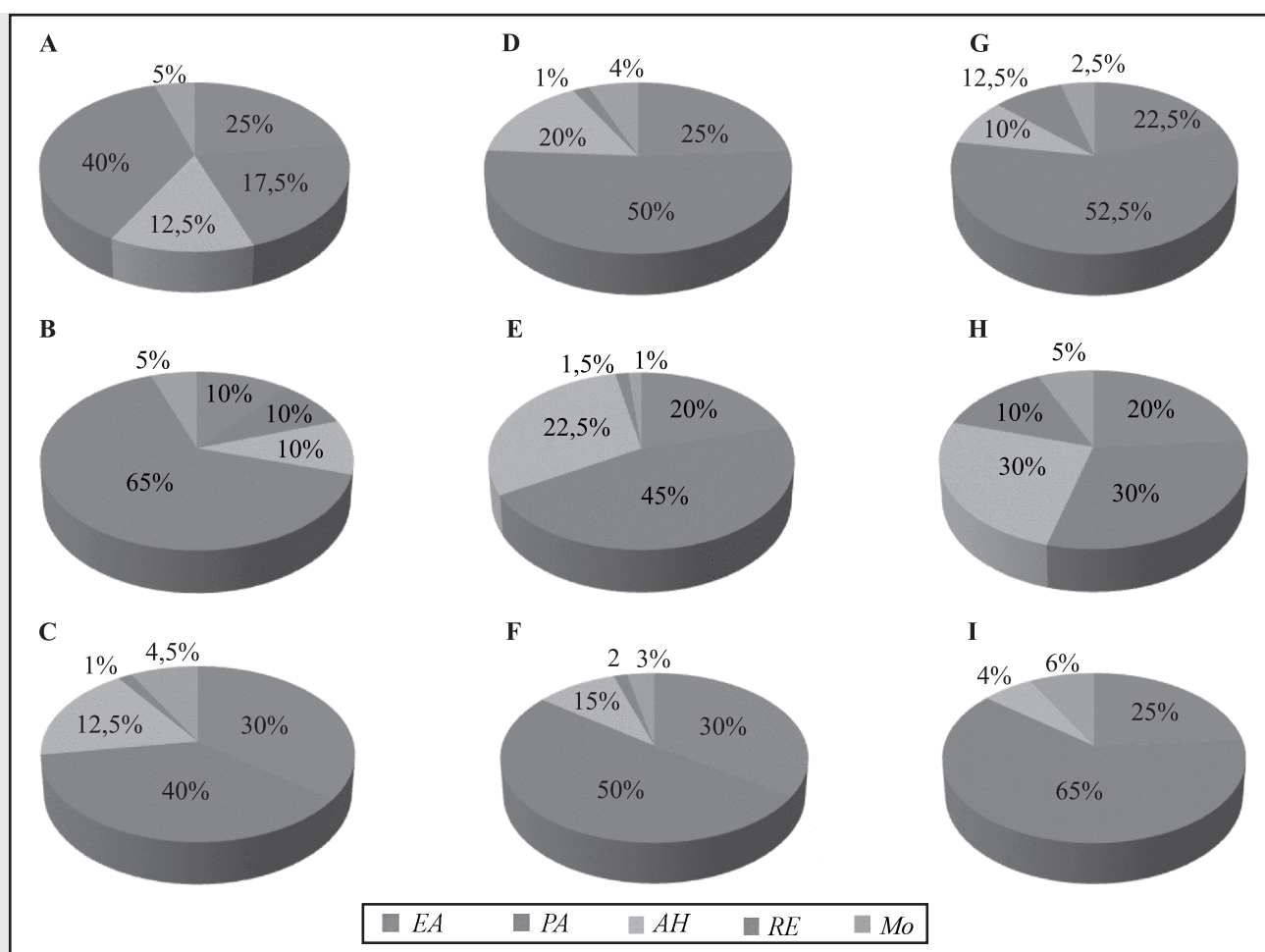
relação as idades observamos diferença no perfil (4ª sdv: 5A a C; 6ª sdv: 5D a F e 8ª sdv: 5G a I). Observamos uma prevalência maior de indivíduos em repouso (RE) na 4ª semana de vida. Na 6ª semana de vida, nos agrupamentos A1 e A2 há a mudança de perfil com maior prevalência de indivíduos EA e PA. Este padrão tende a se manter na 8ª semana de vida, porém com uma discreta diminuição da PA e aumento de RE. Além disso, ressaltamos que a linhagem BALB/c, principalmente na 4ª semana de vida, maior número de animais em Mo.

#### 4 DISCUSSÃO

O camundongo é uma espécie, extremamente ativa, que se empenha em altos níveis nas interações sociais e recíprocas<sup>7,13</sup>. Também apresenta

marcantes comportamentos de nidificação, acasalamento, maternidade, marcação territorial e agressividade (principalmente entre machos em idade adulta)<sup>14-17</sup>. Grande variedade de ensaios sociais tem sido encontrados na literatura para o estudo de comportamentos individuais<sup>18,19,20</sup>. Os exemplos a seguir foram concebidos e descritos para evidenciar a relevância dos tipos de déficits em interações sociais, mais especificamente para serem usados como modelos de autismo. Dentre estes ensaios podemos destacar: a) avaliação das interações sociais recíprocas, e b) avaliação refinada das interações entre pares (jovens ou adultos) em gaiola padrão ou arenas especializadas<sup>20</sup>.

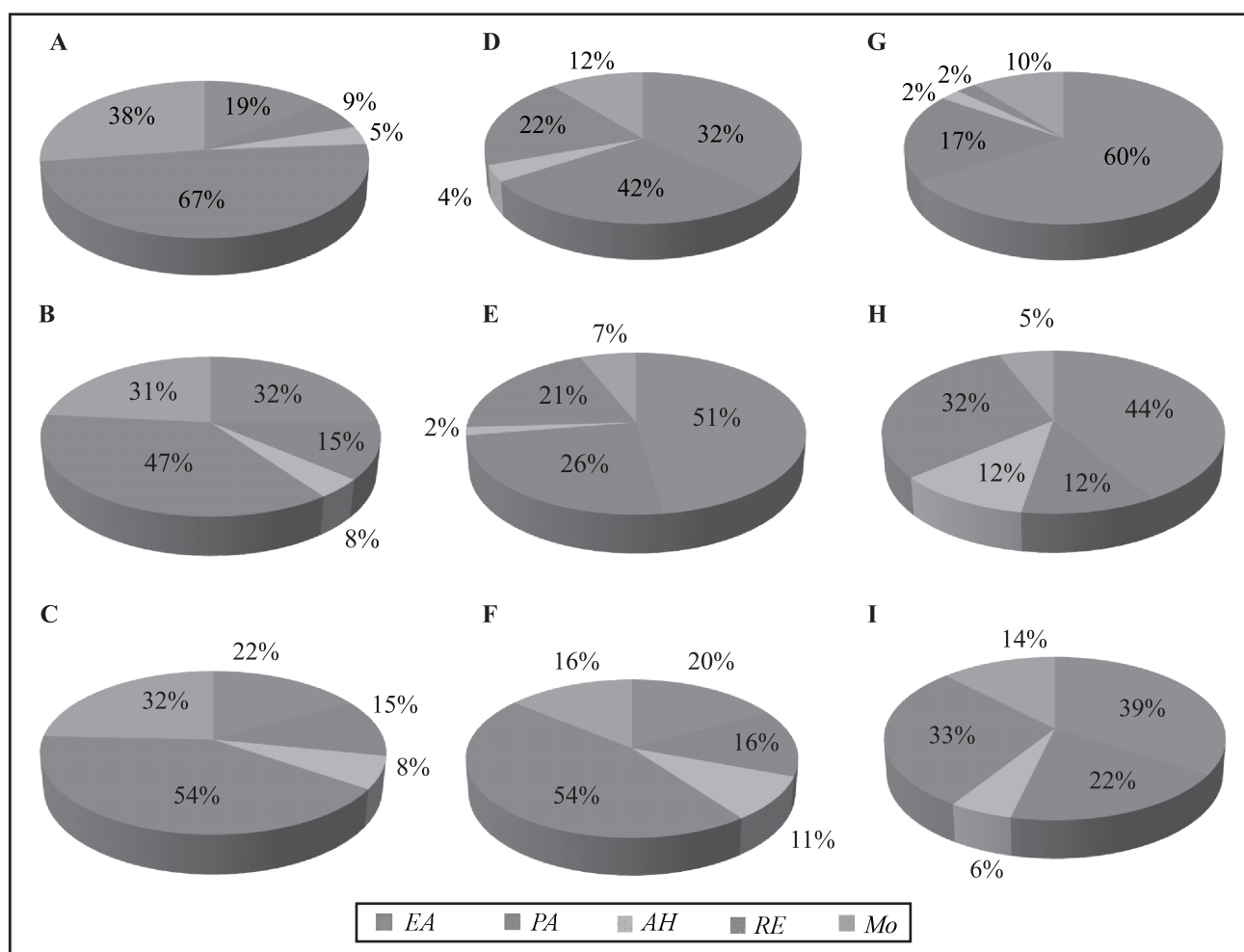
Contudo, um ponto que discutimos é que segundo Haller & Mano, aproximadamente 80% dos estudos comportamentais em camundongos empregaram testes tradicionais e considerados como “clássicos”. Estes testes são: i) Campo aberto, ii) Labirinto em cruz elevado, iii) Teste da suspensão



**Figura 4:** Diferença dos tipos de atividade em relação aos agrupamentos na linhagem Swiss Webster: além das diferenças do perfil de atividade entre as idades, também podemos observar significativa diferença entre os agrupamentos na mesma idade. O agrupamento A1 (A a G) e A2 (B a H) aproximam-se do perfil médio, onde na 4ª semana de vida (A a C) prevalece a atividade de repouso (RE) com maior incidência. Nesta mesma semana, o A3 (C a I) já apresenta a procura de alimentos (PA) com maior incidência. Na 6ª semana (D a F), há semelhança entre a prevalência das atividades, porém o percentual de incidência entre os indivíduos demonstras sutis diferenças. Na 8ª semana (G a I), observamos variação na atividade de auto-higienização (AH) entre os grupos. As atividades de montagem (Mo) manteve sua baixa incidência entre todos os grupos e também entre as idades.

da cauda, iv) Caixa claro/escuro e v) Interação social<sup>21</sup>, e avaliam o indivíduo isolado da sua interação social, ou seja apenas as características individuais são notadas. Além disso, questionamos não a validade destes testes, mas a aplicabilidade destes testes. Todas estas metodologias isolam ou induzem o animal a um comportamento específico

em um local diferente do qual está sendo mantido, principalmente o teste de labirinto em cruz elevado. Importantes informações são adquiridas por estes testes como a característica de ansiedade e depressão dos animais, mas não são capazes de descrever o comportamento individual dos camundongos em seu agrupamento, sua dinâmica social,



**Figura 5:** Diferença dos tipos de atividade em relação aos agrupamentos na linhagem BALB/c: além das diferenças do perfil de atividade entre as idades, também podemos observar significativa diferença entre os agrupamentos na mesma idade. O agrupamento A1 (A a G) e A2 (B a H) aproximam-se do perfil médio, onde na 4ª semana de vida (A a C) prevalece a atividade de repouso (RE) com maior incidência. Nesta mesma semana, o A3 (C a I) já apresenta a procura de procura de alimentos (PA) com maior incidência. Na 6ª semana (D a F), há semelhança entre a prevalência das atividades, porém o percentual de incidência entre os indivíduos demonstras sutis diferenças. Na 8ª semana (G a I), observamos variação na atividade de auto-higienização (AH) entre os grupos. As atividades de montagem (Mo) manteve sua baixa incidência entre todos os grupos e também entre as idades.

a diferença do perfil de comportamento entre os grupos, entre as idades e outros.

Através da metodologia proposta pelo nosso grupo de trabalho foi possível identificar quais são as principais atividades e a sua prevalência apresentadas pelo camundongos (machos) em seu agrupamento no biotério<sup>7,11,22,23</sup>. Estruturamos

uma metodologia que tivesse mínima interferência no ambiente do animal (sua gaiola) e não induzindo as alterações individuais ou interações sociais. Acreditamos que a filmagem a distância e a análise do etograma através dos filmes alcançaram este objetivo. Observamos que, na linhagem Swiss Webster, a incidência dos tipos de atividade assim

como sua prevalência demonstra interessantes diferenças durante o amadurecimento dos animais e entre os agrupamentos. Um número maior de animais recém desmamados (4ª semana de vida, ou seja infantes) mantêm-se em repouso, e também apresentando maior tempo destes animais dormindo. Conforme amadurecem a curiosidade demonstrada pela *EA* e a necessidade da busca pela alimentação, descrita pela atividade (*PA*), torna-se mais prevalente entre os indivíduos dos grupos. A prevalência de *AH* é relativamente constante para cada entre as idades e para cada agrupamento, porém sempre presente. A *Mo* apresentou níveis muito reduzidos durante todo ensaio, porém constante. Possivelmente pela rápida movimentação dos animais da gaiola<sup>7,11</sup>.

Neste trabalho comparamos nossos resultados anteriores com os dados da linhagem BALB/c. Apesar de serem da mesma espécie, há diferenças significativas na prevalência das atividades (*EA*, *PA*, *AH*, *RE* e *Mo*) entre os indivíduos da mesma linhagem, nesse caso BALB/c. Em relação ao tempo de 60 min, essa linhagem apresentou valores percentuais mais uniformes do que a linhagem Swiss Webster para todas as atividades estudadas. Acreditamos que esse dado esteja relacionado ao *status* genético do animal. A linhagem BALB/c é isogênica, minimizando diferença entre os indivíduos e pelos nossos resultados minimiza a diferença no próprio comportamento do animal<sup>3</sup>. Em comparação com o Swiss Webster, são menos ativos, possuem maior prevalência de animais em repouso, e exploram mais o ambiente do que procuram alimento. Interessantemente, esta última atividade seria a mais observada em Swiss entre a 4 e 6ª semana de vida. Entre as idades, os valores percentuais demonstram que a linhagem BALB/c na 4ª semana de vida também tende a ter mais indivíduos em repouso, porém com muito poucos animais realizando auto-limpeza. Na 6ª e 8ª semana de vida, observamos que os animais mudam sua atividade preferencial para exploração do ambiente, seguido de busca de alimento, porém mantendo sempre um número relativamente alto de animais em repouso e baixo em *AH*. Em comparação com o Swiss Webster, podemos afirmar que

há um perfil semelhante para ambas as linhagens na 4ª semana de vida, porém no amadurecimento o BALB/c é menos ativo e prefere explorar mais o ambiente do que buscar alimento. Finalizando, apesar de ser uma linhagem isogênica, também observamos diferenças da prevalência das atividades entre os agrupamentos.

## 5 CONCLUSÃO

Podemos concluir que as principais atividades realizadas pelos camundongos em biotério, tanto da linhagem Swiss Webster quanto da BALB/c, são de repouso (ou dormir) quando infantes (4ª semana de vida). Durante o seu amadurecimento, a linhagem Swiss Webster prefere mais procurar alimento e a linhagem BALB/c explorar o ambiente. Outras peculiaridades podem ser associadas ao BALB/c, como ser menos ativa e em alguns momentos apresentar mais indivíduos em contato um com outro. Também apresentam uma baixa incidência de auto-higienização. Finalizando, apesar de demonstrarem maior uniformidade comportamental entre os seus indivíduos, também apresentam diferença entre os indivíduos de outros agrupamentos, semelhante ao Swiss Webster. Além disso, sugerimos que estes resultados possam servir de parâmetros para a avaliação comportamental de camundongos, diferenciando indivíduos da linhagem Swiss Webster e BALB/c (apesar de serem da mesma espécie) e outros tipos de ensaios, principalmente pré-clínicos.

## 6 AGRADECIMENTOS

À Drª Maria de Nazaré Corrêa Soeiro, Chefe do Laboratório de Biologia Celular / IOC pelo apoio logístico para os ensaios e da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro.

## MICE LAB ETHOGRAM II: WHAT ARE THE MAJOR DIFFERENCES IN THE BEHAVIOR OF SWISS WEBSTER AND BALB/c?

The behavior of mice in animal facilities is an important area of animal laboratory science. Although the literature describing numerous models of various approaches to study behavior (anxiety, depression, aggressiveness, etc.), these models are characterized by inducing the desired behavioral phenotype. In this work, we sought to determine the behavioral pattern of healthy mice from their weaning to adulthood and compare the data between two strains: Swiss Webster and BALB/c. We base our methodology on the observation of clusters, maintaining its interactions without inducing or interfering in social dynamics. Together with an ethogram cataloging prevalent activities such as environmental exploration, search for food, self-cleaning, physical contact and rest. We quantified the impact of these activities demonstrated by each individual in his group during 60 minutes. Our results demonstrate that in both strains there was no greater incidence of sleep in young mice or a change in the maturity profile. The Swiss Webster strain prevails in the search for food, followed by exploration of the environment. In BALB/c there is the prevalence in the use of the environment and the home. In addition, BALB/c showed a low prevalence and high self-cleaning to physical contact as compared to the Swiss Webster strain. Another important point is that besides the change in the profile of activity during ages, each group presents a profile of the incidence of different activities, and the peculiar dynamics of each group. Therefore we conclude that these parameters are important for establishing healthy patterns of behavior.

**Keywords:** Mice. Animal behaviour. Ethogram.

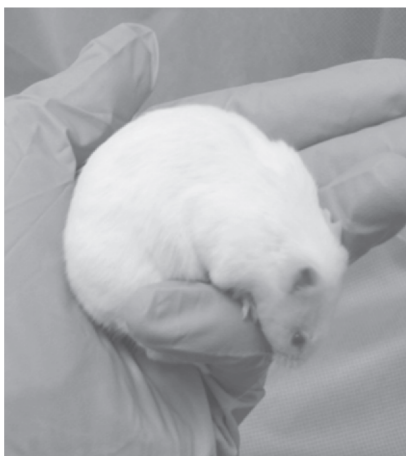
ABSTRACT

1. Lapchik V, Mattaraia V, Ko G. Rotina e manejo das espécies. In: Lapchik V, Mattaraia V, Ko G, editores. Cuidados e manejos de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 251-63.
2. Ko GM, De Luca, RR. Camundongo. In Lapchik V, Mattaraia V, Ko G, editores. Cuidados e manejos de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 137-67.
3. Jacoby RO, Fox GM. Biology and Diseases of Mice In: Fox GM, Cohen JB, Franklin ML, editors. Laboratory animal medicine. Academic Press. New York. 1984. p. 31-88.
4. Canadian Council on Animal Care. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Toronto. 1998. p. 129-46.
5. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals / Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council, Washington:National Academy Press; 2010. p. 36-54.
6. Araújo-Jorge TC. Modelos animais para o estudo *in vivo* da Doença de Chagas - Camundongo. In: Araújo-Jorge TC. & de Castro SL. editors. Doença de Chagas: Manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 2000. p. 366-8.
7. Oliveira GM. Comportamento Social de Camundongos em Biotérios de Experimentação. In: Mattaraia VM, Oliveira GM. Editores. Comportamento de Camundongos em Biotério. São Paulo: Poloprint; 2012. p. 137-67.
8. Roche Labs. 2012. Fase pré-clínica. [Citado em maio de 2013]. Disponível em: [<http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/investigacao/fase-pre-clinica/>].
9. OECD guidelines. 2012. [Citado em maio de 2013]. Disponível em: [<http://www.oecdguidelines.nl/guidelines/science-technology/>].
10. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi

REFERÊNCIAS

- H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35(3): 206-21.
11. Chumbinho LC, Pereira da Silva LCC, Pizzini CC, Batista WS, de Oliveira FS, Oliveira GM. Etograma de camundongos em biotério: Quais são as principais atividades deste animal dentro da gaiola? *RESBCAL* 2012; 1(3): 25-31.
12. Ko GM, Damy SB. Controle do macro e microambiente. In: Lapchik VV, Mattaraia VM, Ko GM editores. *Cuidados e manejo de animais de laboratório.* São Paulo: Atheneu; 2009. p.273-93.
13. Anderson PK. Density, social structure, and nonsocial environment in house mouse populations and the implications for regulation of numbers. *Trans Nat Acad Sci.* 1961; 1 (5): 23-5.
14. Bisazza A. Social organization and territorial behaviour in three strains of mice. *Boll Zoo.* 1988; 48: 157-67.
15. Crowcroft P. Territoriality in mild house mice, *Mus musculus.* *J Hlammal.* 1955; 36: 299-301.
16. Mondragon R, Mayagoitia L, Lopez-Lujan A, Diaz JL. Social structure features in three inbred strains of mice C57BI/6J, BALB/cJ and NIH: Comparative study. *Behav and Neu Biol.* 1987; 47: 384-91.
17. Hilakivi LA, Lister RG, Durcan MJ, Ota M, Eskey R, Mefford I, Linnoila M. Behavioral, hormonal and neurochemical characteristics of aggressive alpha mice. *Brain Res.* 1989; 502: 158-66.
18. Mattaraia VGM. Enriquecimento ambiental. In: Lapchik VB, Mattaraia VGM, Ko GM, editores. *Cuidados e manejo de animais de laboratório.* São Paulo: Atheneu; 2009. p. 537-47.
19. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology.* 1987; 92: 180-85.
20. Malatynska E, Knapp RJ. Dominant-submissive behavior as models of mania and depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005; 29 (4-5): 715-37.
21. Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11(7): 490-502.
22. Haller J, Mano A. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. *Curr Opin Psychiatry.* 2011; (25): 59-64.
23. Terranova ML, Laviola G. Scoring of social interactions and play in mice during Adolescence. *New Jersey: Ed Wiley;* 2005.p. 134-40.

**Associe-se à SBCAL/COBEA  
e participem do  
desenvolvimento  
da ciência dos animais  
de laboratório através  
do conhecimento,  
promoção e uso  
ético dos animais.**



# MONITORAMENTO AMBIENTAL NO BIOTÉRIO

Alzira Batista Cecílio<sup>1</sup>  
Elizangela Cristina de Paula Donato<sup>2</sup>

**RESUMO**

1. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUC Minas/Fundação Ezequiel Dias - FUNED (Serviço de Biotecnologia e Saúde), MG, Brasil.
2. Fundação Ezequiel Dias - FUNED (Serviço de Biotério), MG, Brasil.

Autor para correspondência:  
Alzira Batista Cecílio  
E-mail: alzira.cecilio@funed.mg.gov.br

Recebido para publicação: 14 de junho de 2013  
Aceito para publicação: 05 de julho de 2013

O campo de estudo deste trabalho é o Biotério de criação da Fundação Ezequiel Dias-FUNED, onde as identificações bioquímicas dos microrganismos foram realizadas nos Laboratórios do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas e Serviço de Micologia e Micotoxinas da FUNED e, as identificações moleculares no Laboratório do Serviço de Biotecnologia e Saúde da FUNED.

Os animais criados em Biotério tem como finalidade garantir a qualidade de experimentos biológicos que visam à melhoria da qualidade de vida humana. Há muito, experimentos vem sendo testados com metodologias alternativas para a diminuição da escolha pelo modelo animal, em razão de questões éticas. O campo de estudo deste trabalho é o Biotério da Funed, onde são criados os camundongos da linhagem *Swiss webster*, tendo como objetivo geral, melhorar o controle na qualidade animal já realizado. O monitoramento ambiental proposto por este trabalho vem contribuir no sentido de minimizar a entrada de microrganismos através de barreiras sanitárias mais eficientes. Sendo monitorado o ambiente da sala Piloto (colônia de fundação). A metodologia utilizada foi o plaqueamento da área, com exposição de 20 minutos. Foram realizadas identificações das colônias bacterianas que tiveram crescimento, após 48 horas de incubação à 35°C, através da análise bioquímica e características morfológicas observadas na coloração de Gram. E uma segunda identificação molecular foi realizada, utilizando iniciadores específicos. Colônias de fungos também foram observadas no crescimento após incubação à temperatura ambiente e, identificadas. Este trabalho possibilitou observar a eficiência na desinfecção do Biotério com a redução significativa do número de microrganismos, além de avaliar a importância do monitoramento da saúde animal e a sua relevância na busca do alto padrão sanitário almejado na produção de animais utilizados em pesquisas científicas.

**Palavras-chave:** Animais de laboratório. Microbiologia. Monitoramento ambiental. Biologia molecular.

## 1 INTRODUÇÃO

Por mais de um século, os animais de laboratório vem sendo utilizados na pesquisa biomédica. Estudos de anatomia, fisiologia, imunologia e virologia, dentre outros, realizados em animais de laboratório, permitiram um avanço considerável no desenvolvimento da ciência e tecnologia<sup>1</sup>.

Atualmente, porém os pesquisadores exigem que esses animais reúnam condições ideais, isto é, que atendam aos parâmetros de qualidade genética e sanitária, uma vez que nada mais são

que, “reagentes biológicos” e, os resultados dos experimentos são afetados em razão da qualidade de cada espécie utilizada<sup>1</sup>.

Para assegurar a produção de animais de laboratório, na qualidade que satisfaça os requisitos para o uso nas pesquisas médicas, são necessárias instalações apropriadas, equipamentos especializados e, pessoal habilitado<sup>1</sup>.

Em 8 de outubro de 2008, foi sancionada a Lei 11.794, conhecida como a Lei Arouca e regulamentada em 15 de julho de 2009 através do Decreto 6.899, legislação que efetivamente regulará a criação e o uso de animais para pesquisa e o ensino em âmbito nacional<sup>2</sup>.

A experimentação animal é uma atividade humana com grande conteúdo ético. Os problemas éticos da experimentação animal surgem do conflito entre as justificativas para o uso de animais em benefício de si próprios e do homem e o ato de não causar dor e sofrimento aos animais. Esse conflito é inevitável, e só pode ser tratado equilibrando-se os valores opostos. Quanto maior o sofrimento que um experimento irá causar aos animais, mais difícil é a sua justificativa<sup>1</sup>.

O princípio ético de reverência pela vida exige que se obtenha um ganho maior de conhecimento com um custo menor no número de animais utilizados e com o menor sofrimento dos mesmos<sup>1</sup>.

O camundongo (*Mus musculus*), um dos animais de laboratório mais utilizados na experimentação, acompanha o homem por vários milênios. Existem registros acerca desse animal com mais de 4 mil anos de idade e até mesmo na Bíblia. Sua introdução como animal de laboratório, deve-se ao fato de, ser pequeno, muito prolífero, ter período curto de gestação, ser de fácil domesticação e manutenção<sup>1</sup>.

O biotério é uma instalação dotada de características próprias, que atende às exigências dos animais onde são criados ou mantidos, proporcionando-lhes bem estar e saúde para que possam se desenvolver e reproduzir, bem como para responder satisfatoriamente aos testes neles realizados<sup>1</sup>.



Foto: Elizangela C. P. Donato

**Figura 1:** *Mus musculus* (Swiss webster) - Biotério de criação da Funed.

As barreiras sanitárias visam impedir que agentes indesejáveis presentes no meio ambiente externo, tenham acesso às áreas de criação ou experimentação, bem como agentes patogênicos em teste venham a se dispersar para o exterior do prédio. Assim sendo, barreira sanitária compreende todo um conjunto de elementos físicos, químicos, de instalações, de procedimentos de pessoal e uso de equipamentos, que tende a impedir a entrada de enfermidades que possam afetar os animais. Como principal barreira física, por exemplo, a existência de autoclave para esterilização de materiais<sup>1</sup>.

No estabelecimento de procedimentos operacionais padronizados de higiene de um biotério, com o intuito de prevenir contaminação biológica na área de criação, quatro fatores devem ser levados em consideração: a natureza dos agentes infecciosos; as vias prováveis de entrada de tais agentes na área de criação; os meios pelos quais tais agentes podem ser destruídos ou prevenidos nas vias de entrada; e, finalmente, a validação dos métodos higiênicos adotados<sup>2</sup>.

A contaminação biológica indesejável na área de criação e manutenção de animais pode ocorrer por várias vias e materiais. As fontes mais importantes de infecções são: animais e materiais biológicos de outros laboratórios; pessoal; insetos e roedores selvagens; materiais e equipamentos. O risco de introdução inadvertida de microorganismos nas unidades experimentais é muito maior que nas unidades de criação devido à necessidade de acesso de novos animais, materiais de experimentação e pessoas nas instalações experimentais<sup>2</sup>.

A limpeza de um biotério deve ser realizada de preferência imediatamente após uso do material ou local, para evitar o ressecamento da sujidade que dificulta a sua remoção. Deve contemplar todas as superfícies do material, incluindo canais e ranhuras. Na limpeza manual, a sujidade é removida manualmente por meio de ação física com auxílio de detergente, água e artefatos, como escova e esponja. Já na limpeza automatizada é o processo onde se utiliza tecnologia automatizada que combina temperatura, produto químico, ação mecânica e tempo. Proporciona menor risco de



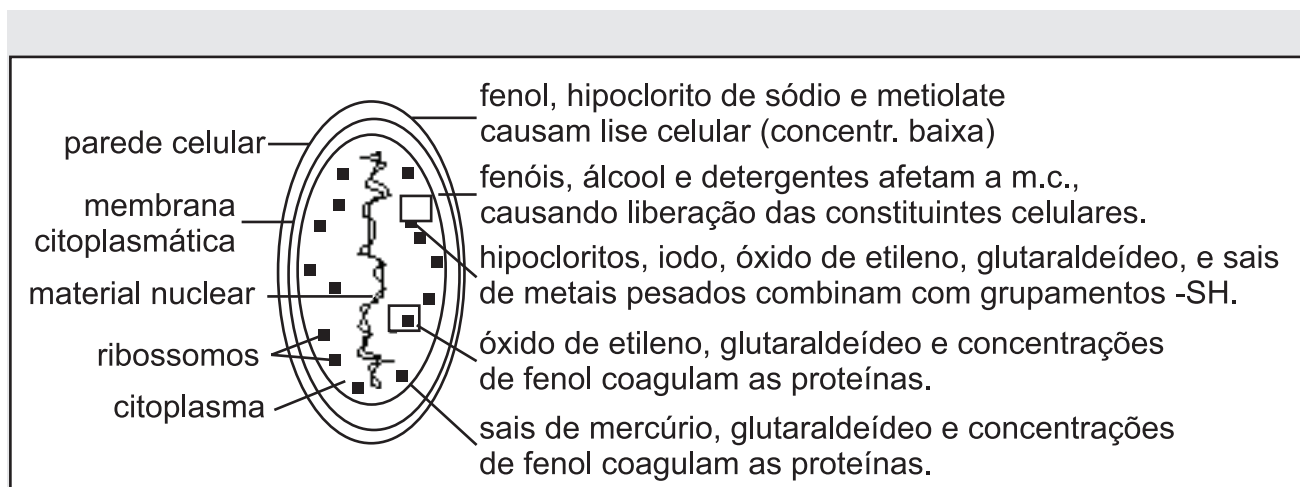
acidente aos profissionais e melhor padronização do processo<sup>2</sup>.

A desinfecção num biotério é realizada por meio de produtos químicos (desinfetantes) ou por meios físicos.<sup>2</sup> Algumas características importantes em um desinfetante, para que se possa atingir o nível de desinfecção desejado, são terem amplo espectro, ação rápida, fácil manuseio, atóxico, baixo custo, entre outros<sup>3</sup>.

Existem vários desinfetantes que são utilizados em biotérios, tais como fenóis, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, compostos de amônio quaternário, álcoois, aldeídos (formaldeído e glutaraldeído), halogenados (cloro e iodo), entre outros<sup>2</sup>.

A área controlada (ou área limpa) do Biotério possui 6 salas destinadas à criação dos animais: sala Piloto (colônia de fundação), sala Recria do Piloto (colônia de expansão), sala da Expedição e 3 salas de produção. São exemplos de barreiras sanitárias no Biotério da Funed: a autoclave (esterilização sob calor úmido), onde serão esterilizados os materiais utilizados na área de criação dos animais; o ultrassom, que é utilizado na limpeza dos bicos dos bebedouros e, que serão esterilizados posteriormente em autoclave; paramentação dos profissionais do biotério, que consiste no

banho obrigatório e uso de uniforme estéril, touca e máscara descartáveis, uso de luvas (para manipulação de materiais e dos próprios animais) e calçados próprios; e, ainda a desinfecção das salas (teto, parede, chão), realizadas 1 vez por mês, com solução de hipoclorito a 0,2%. O chão é limpo com solução de hipoclorito a 0,2% diariamente, após a rotina de trabalho, que é realizada em cima de carrinhos de alumínio (trocas de caixas, desmames e pesagens). As estantes de alumínio são limpas com álcool a 70%. A temperatura e umidade das salas são monitoradas através de termo-higrômetro, apresentando variações de 18 a 20°C e 50 a 60%, respectivamente. Em todas as salas há trocas de ar (20 trocas/hora) e as portas possuem pressão positiva (por exemplo, enquanto a porta de saída para a área de higienização estiver aberta, a outra, de saída para o corredor da área controlada, deve estar fechada). Os animais são mantidos em gaiolas, com ração e água à vontade, sendo mantidas rotinas diárias de troca de caixas, desmame, registro de nascimento (salas de produção, sala Piloto); acasalamentos (sala recria do Piloto); manutenção de matrizes (sala Piloto) e atendimento aos clientes internos da Funed, como o controle biológico, o serpentário e a pesquisa (sala Expedição).



Fonte: JAIGOBIND *et al.*, 2007.

**Figura 2:** Ação dos desinfetantes na estrutura bacteriana.

Os objetivos propostos neste trabalho são monitorar o ambiente dos camundongos da sala Piloto (colônia de fundação) avaliando a eficiência dos métodos usados na desinfecção como descrito acima; possibilitar a padronização do controle ambiental do Biotério da Funed; implantar o controle da saúde dos camundongos *Swiss webster*; demonstrar a importância do monitoramento ambiental para manutenção da qualidade dos animais de laboratório através da identificação de possíveis espécies/gêneros bacterianos e fúngicos patogênicos; além de comparar a identificação bacteriana através de características bioquímicas e moleculares.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O campo de estudo deste trabalho é o Biotério da Funed, que cria os camundongos da linhagem *Swiss webster*. Esses animais são utilizados no Controle biológico da Funed, pelo Serpentário da Funed na alimentação de serpentes e, também nas experimentações científicas. O ambiente monitorado foi a sala Piloto (colônia de Fundação) do Biotério da Funed e os métodos utilizados são explicados a seguir.

O estudo estatístico não foi utilizado, pois o objetivo deste estudo não foi de estimar uma quantidade ou testar uma hipótese, e sim coletar dados concretos.

### 2.1 Plaqueamento

Foram utilizadas seis placas de Ágar TSA (meio de cultura que proporciona o crescimento de vários microrganismos) antes da desinfecção da sala e seis depois da desinfecção. As placas foram colocadas em três níveis na sala de fundação: ao nível do chão, sobre um carrinho, o qual é utilizado para rotina de manutenção dos animais, e em cima da estante dos animais. O tempo de exposição das placas foi de 20 minutos.

As placas de TSA foram incubadas a 35°C (+-2°C) por 48 horas.

Foram também utilizadas seis placas de Ágar Sabouraud (meio seletivo para fungos), três antes da desinfecção e três depois da desinfecção, distribuídas nos mesmos níveis e, com o mesmo tempo de exposição utilizado para as placas de Ágar TSA.

As placas de Ágar Sabouraud foram mantidas à temperatura ambiente por 15 dias.

## 2.2 Identificação das bactérias

As colônias bacterianas foram identificadas segundo suas características morfológicas e bioquímicas. Foram confeccionados esfregaços em lâminas submetidas à coloração de Gram. Foram realizadas provas de catalase e bioquímicas.

### 2.2.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi desenvolvida em 1884, pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram. Ela é um dos procedimentos de coloração mais úteis, pois classifica as bactérias em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas<sup>4</sup>.

As lâminas após terem sido submetidas à coloração de Gram foram observadas ao microscópio em objetiva de imersão. Todas as colônias observadas eram Gram-positivas, sendo distintas apenas em sua morfologia e arranjo. Foram observadas colônias em forma de Bastonetes Gram-positivos, Cocos Gram-positivos em cadeias curtas e isoladas e Cocos Gram-positivos em cachos pequenos e alguns Cocos Gram-positivos em tétrades.

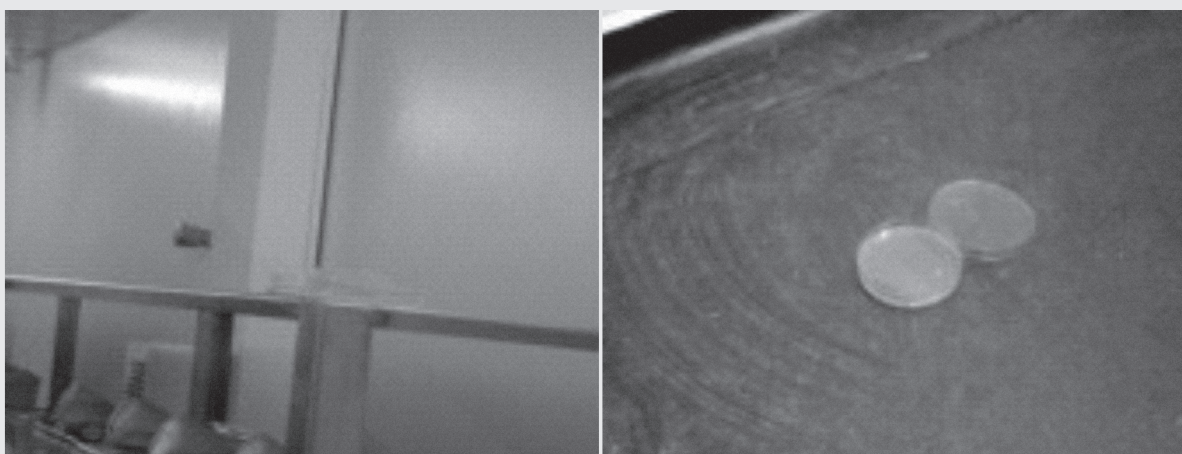
### 2.2.2 Prova da Catalase

O teste mais importante na identificação da família Micrococcaceae é a prova da catalase, e esta família é composta de quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*. O gênero *Staphylococcus* apresenta 32 espécies, 14 subespécies, sendo que somente 15 espécies são encontradas em amostras humanas<sup>5</sup>.



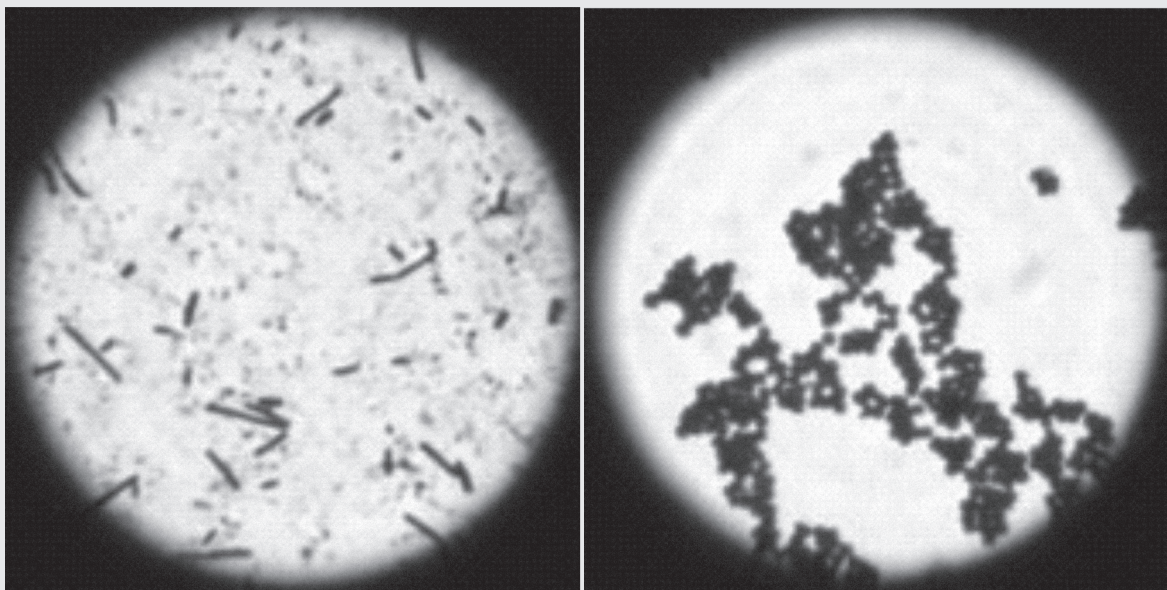
Fotos: Elizangela C.P. Donato

**Figura 3:** Sala Piloto e distribuição das placas.



Fotos: Elizangela C.P. Donato

**Figura 4:** Plaqueamento ao nível da estante e chão.



Fotos: Elizangela C. P. Donato

**Figura 5:** Coloração de Gram evidenciando bactérias Gram-positivas (bacilos e cocos respectivamente).

Com a alça bacteriológica coleta-se o centro de uma colônia suspeita e esfrega-se em uma lamina de vidro. Colocar sobre este esfregaço uma gota de água oxigenada a 3% e observar a formação de bolhas. Para a família Micrococcacea (estafilococos) a prova é geralmente positiva, enquanto que para a família Streptococcacea (estreptococos) é negativa<sup>5</sup>.

### 2.2.3 Provas Bioquímicas

Testes bioquímicos são frequentemente utilizados para identificar bactérias e leveduras porque espécies diferentes produzem enzimas diferentes. Tais testes são designados para detectar a presença de enzimas<sup>4</sup>.

#### 2.2.3.1 Manitol

O *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de fermentar o manitol em meio contendo 7,5% de cloreto de sódio, denominado ágar manitol salgado ou Meio de Chapman. O indicador de

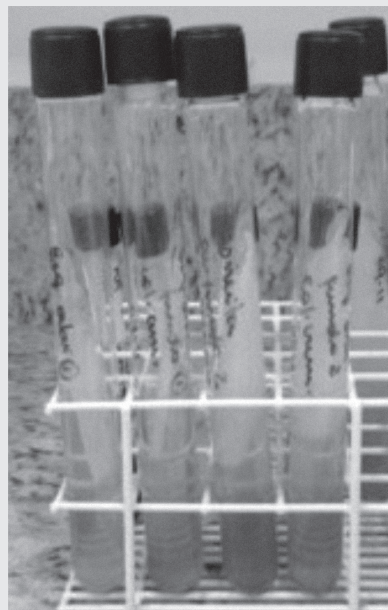


Foto: Elizangela C. P. Donato

**Figura 6:** Testes positivos de crescimento de *Staphylococcus* spp em ágar manitol salgado.

pH é o vermelho de fenol, que indica uma reação positiva quando o meio ao redor das colônias se torna amarelo e, negativa quando permanece avermelhado<sup>5</sup>.

### 2.2.3.2 Teste da Bile Esculina e do BHI 6,5% NaCl

Segundo o Módulo V, Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica<sup>5</sup>, deve-se semear as provas de Bile Esculina e do caldo de NaCl a 6,5%; incubar da mesma forma. O Teste da bile esculina positiva apresenta cor marrom escuro e o do caldo de NaCl a 6,5% deve mostrar turvação para ser considerado positivo.

Todos os estreptococos do grupo D de Lancefield apresentam a bile esculina positiva, seja *Enterococcus* spp ou *Streptococcus* do grupo D não enterococo (*Streptococcus bovis*). Quanto ao teste da tolerância ao NaCl a 6,5%, somente os enterococos são positivos.

### 2.2.3.3 Teste da DNase

Este teste consiste na inoculação de colônias em meio contendo DNA, (DNase test agar) obtido comercialmente<sup>5</sup>.

### 2.2.4 Congelamento das Bactérias

Para o congelamento, as cepas identificadas foram plaqueadas em Ágar Batata (pode ser utilizado também o Ágar Nutriente) e, após a incubação à 35°C ± 2°C por 18 a 24 horas foi preparado uma suspensão bacteriana. Essa suspensão foi feita utilizando todo o crescimento bacteriano da placa. Com auxílio de um swab foi “raspado” todo crescimento e colocado em um tubo contendo 2,5 mL de Caldo BHI. Foi acrescentado à essa suspensão 0,5 mL de Glicerol P.A. Após preparo, a suspensão foi acondicionada em eppendorfs identificados e congelados a -80°C.

### 2.2.5 Extração de DNA (bactérias)

Foram realizadas as extrações de DNA das culturas bacterianas à partir das suspensões feitas.

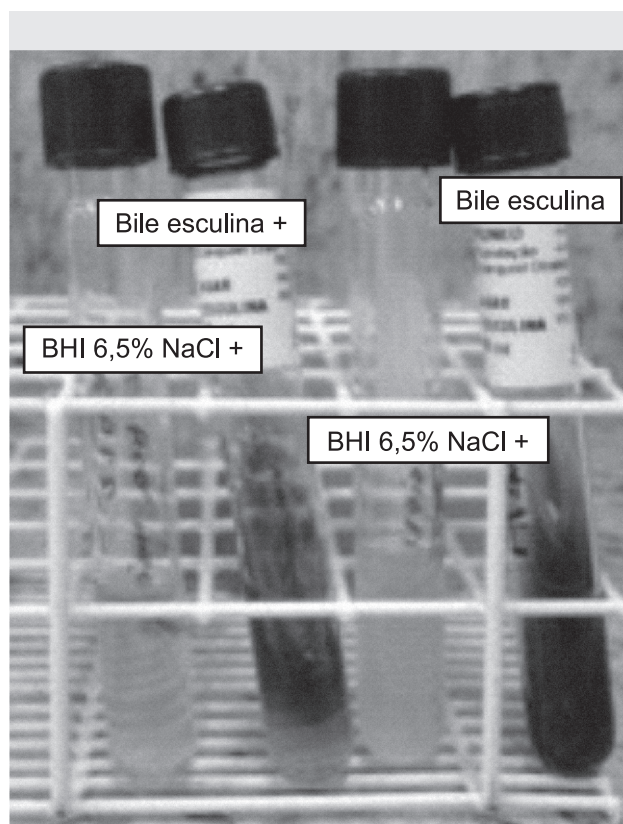


Foto: Elizangela C.P.Donato

**Figura 7:** Teste positivos da Bile Esculina e BHI 6,5% NaCl.

De cada amostra, foram retirados 500 µl da cultura em overnight e colocados em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Procedeu-se a seguir à centrifugação por 2 minutos a 13.000 x g para sedimentação das células e, o sobrenadante é desprezado posteriormente. Ressuspendeu-se as células adicionando 480 µl de solução de EDTA a 50 mM (pH 8.0). Em seguida, adicionou-se 120 µl de lisozimas (10mg/mL), pipetando gentilmente o mix. Os microtubos foram incubados em banho-maria por 1 hora a 37°C e, em seguida as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 13.000 x g e o sobrenadante novamente é desprezado. As células foram ressuspendidas adicionando 600 µl de Nuclei Lysis Solution. Posteriormente as amostras foram incubadas a 80°C por 5 minutos para lisar as células. Após a

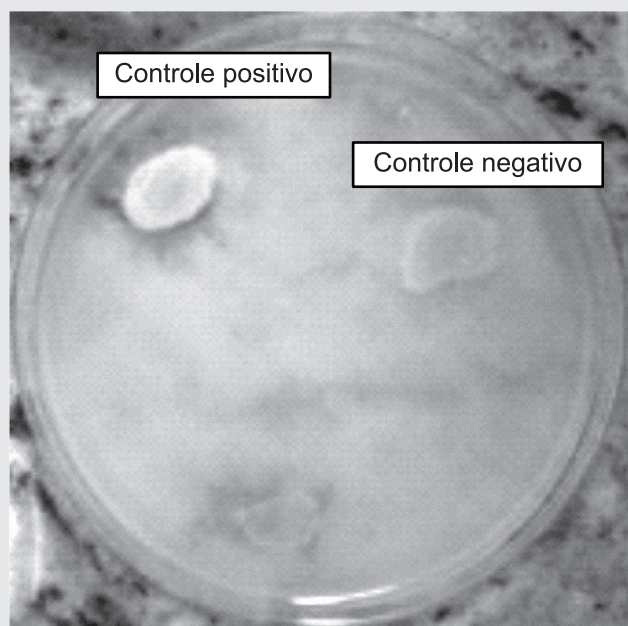


Foto: Elizangela C.P. Donato

**Figura 8:** Teste de DNase mostrando o teste, controle positivo e negativo.

incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, sendo adicionados 1,5 µl de solução de RNase nas células lisadas. A solução foi gentilmente misturada por inversão e depois incubada em banho-maria a 37°C por 1 hora. Após resfriadas em temperatura ambiente foram adicionados 200 µl de solução de precipitação de proteínas agitando vigorosamente em vórtex por 20 segundos. As amostras em seguida foram incubadas no gelo por 5 minutos, sendo centrifugadas por 3 minutos a 13.000 x g e o sobrenadante, contendo o DNA, foi cuidadosamente transferido para outro microtubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol. A solução foi gentilmente misturada por inversão até a precipitação do DNA e centrifugada por 2 minutos a 13.000 x g. O sobrenadante foi descartado e em seguida 600 µL de etanol 70% foram adicionados, sendo o microtubo invertido várias vezes e centrifugado por 2 minutos a 13.000 x g. O sobrenadante foi descartado e após a secagem do sedimento,

adicionou-se 50 µL de solução de reidratação e as amostras foram incubadas a 4°C *overnight* para a completa reidratação do DNA.

## 2.2.6 Quantificação do DNA

Para quantificar o DNA, foi utilizado a diluição de 1:30. A quantificação do DNA foi feita no aparelho Gene Quant.

## 2.2.7 Reação em Cadeia de Polimerase - PCR

O PCR *Supermix* (Invitrogen) foi utilizado para as reações de PCR contendo 32 mM TRIS-CL (pH 8.4), 55 mM KCL, 1,65 mM MgCL<sub>2</sub>, 220 mM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP), 2,2 U de Taq DNA polimerase em um volume final de 22,5 µL. Concentração do DNA genômico das amostras estudadas de 50ng/µL.

As reações foram processadas no termociclador Veriti (*Applied Biosystems*). Para as amostras bioquimicamente identificadas como *Staphylococcus* spp e *Bacillus* spp seguiu as seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos (desnaturação a 94°C- 1 minuto; anelamento: *Staphylococcus* spp a 60°C-1 minuto e *Bacillus* spp a 65°C- 1 minuto; extensão a 72°C-2 minutos) e extensão final a 72°C por 10 minutos. E, para as amostras bioquimicamente identificadas como *Enterococcus* spp e *Streptococcus* spp foram: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos (desnaturação a 95°C- 1 minuto; anelamento a 55°C- 1 minuto; extensão a 72°C- 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) foi utilizada para analisar os fragmentos de DNA amplificados pelas reações de PCR com base no seu tamanho de peso molecular. Foram analisados 10 µL de cada reação em géis de poliácridamida 8% (acrilamida e bis-acrilamida ultrapura a 30%, Invitrogen) em TBE (0,089 M TRIS, 0,089 M ácido bórico, 0,002 M EDTA). Os géis foram submetidos à eletroforese, utilizando-se tampão TBE, e corados com nitrato de prata (0,1 g/50 mL de água).

Tabela 1: Oligonucleotídeos Iniciadores.

Bactérias	Iniciadores	Produto
<i>Bacillus spp</i>	BACF: 5'-GGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT-3' R1378: 5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3' <sup>14</sup> .	1300 pb
<i>Enterococcus spp</i>	ENT 1: 5'- TACTGACAAACCATTTCATGATG-3' ENT 2: 5'- AACTTCGTCACCAACGCGAAC- 3' <sup>15</sup>	112 pb
<i>Staphylococcus spp</i>	STAPH 69B: 5'-GAACRGAYRAGRAGCTTG-3' STAPH 1416: 5'-GAAGCCGGTGGAGTAACCA-3' <sup>16</sup>	1392 pb
<i>Streptococcus spp</i>	STREP 1F: 5'-AGTCGGTGAGGTAACCGTAAG-3' STREP: 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3' <sup>17</sup>	105 pb

### 2.3 Identificação dos Fungos

De acordo com o Módulo VII de Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica<sup>6</sup>, as estruturas microscópicas, tais como: hifa hialina ou demácia, septada ou cenocítica, forma, disposição e formação dos esporos, são suficientes, em geral, para a identificação de fungos filamentosos. A identificação das colônias filamentosas foi feita a partir da purificação da colônia. Foi retirada uma parte da colônia, sendo esta colocada em tubo plástico tipo eppendorf contendo 1 mL de Tween 80 (0,1%) e agitada em vortex até que estivesse bem fragmentada. Após fragmentação da colônia foram pipetados 20 µl da suspensão e inoculada em três pontos distintos, nos meios Czapek e MEA (Ágar Extrato de Malte), incubando as placas na BOD (incubadora) a 25°C+<sub>-</sub>2°C sem inverter a posição, por 7 dias. Ao longo do tempo de incubação, foram observadas as características macroscópicas das colônias no verso e reverso das placas (cor, textura, tamanho, presença de exsudato). A observação microscópica foi feita a partir de lâminas preparadas. Estas foram preparadas retirando-se com alça descartável uma porção interna de uma das colônias com profundidade, transferindo essa porção para uma lâmina contendo uma gota do corante ácido láctico azul, fragmentando-a ao máximo possível com o auxílio da alça, pingando uma gota de solução desinfetante de álcool.

A identificação dos fungos foi realizada a partir das características microscópicas e macroscópicas observadas com auxílio de uma chave de identificação.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Bactérias identificadas

Após o tempo de incubação das placas de Ágar TSA, observou-se o crescimento de 8 colônias bacterianas (confirmadas pela coloração de Gram, posteriormente) nas placas antes da desinfecção e 5 após desinfecção. As características morfológicas observadas ao microscópio foram determinantes para a sequência da identificação. Por falta de meios de cultura específicos, não foi possível a identificação da espécie bacteriana. Os gêneros bacterianos identificados foram: *Bacillus spp*, *Enterococcus spp*, *Staphylococcus spp*, além de colônias sugestivas de *Corynebacterium spp* e *Micrococcus spp*.

#### 3.1.1 *Bacillus spp*

O gênero *Bacillus* compreende cerca de 50 espécies de bacilos anaeróbios facultativos que podem exibir a forma esporulada, corando-se mal

Tabela 2: Bactérias encontradas antes e após desinfecção

Placas (identificação)	Antes da Desinfecção	Após Desinfecção
	Bactérias	
Esquerda entrada (chão)	<i>Staphylococcus</i> spp	NHC
Direita entrada (estante)	<i>Enterococcus</i> spp*	NHC
Meio 1 (carrinho)	<i>Enterococcus</i> spp	<i>Enterococcus</i> spp
	<i>Micrococcus</i> spp**	<i>Staphylococcus</i> spp
	<i>Corynebacterium</i> spp**	
Meio 2 (carrinho)	NHC	<i>Bacillus</i> spp
Esquerda fundo (chão)	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Staphylococcus</i> spp
	<i>Staphylococcus</i> spp	
Direita fundo (estante)	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Staphylococcus</i> spp

Fonte: Dados da Pesquisa

\*Não foi congelada, colônia semelhante ao Meio 1 (após desinfecção).

\*\*Colônias sugestivas, não havia meios específicos para identificação.

NHC = Não houve crescimento.

pela violeta, quando em colônia mais velhas. As formas vegetativas são retas largas, podendo ser grandes, isolados ou em cadeias<sup>5</sup>.

A forma e localização dos endósporos são úteis para sua classificação<sup>5</sup>, sendo que podem ser cilíndricos, ovais, redondos, e eventualmente com forma de feijão; posição central, sub-terminal, terminal ou dilatando ou não a célula mãe.

Os *Bacillus* spp encontram-se basicamente no solo, água, matéria orgânica animal e vegetal nas condições mais variadas de temperatura, umidade, pH, etc. As duas espécies mais importantes e que devem ser reconhecidas pelo laboratório de microbiologia são o *B. anthracis* e *B. cereus*<sup>5</sup>.

### 3.1.2 Enterococcus spp

Os enterococos apresentam importância crescente como causadores de infecção hospitalar, pelo aparecimento de resistência quase total aos antibióticos tradicionalmente utilizados para tratamento destas infecções<sup>5</sup>.

Os Enterococos mais comumente isolados são: *Enterococcus faecalis* (90% dos casos) e *Enterococcus faecium*, com grande capacidade de colonização de pacientes e de contaminarem superfícies ou equipamentos utilizados em hospitais. Possuem sensibilidade ou resistência variável aos antibióticos chamados glicopeptídios como a vancomicina e teicoplanina. Existem, atualmente, cepas comensais naturalmente resistentes a vancomicina e que podem ser isoladas de pacientes internados, porém não sendo ainda capazes de causarem surtos, mas que devem ser corretamente identificadas<sup>5</sup>.

### 3.1.3 Staphylococcus spp

Os Estafilococos são as bactérias não esporuladas que mais resistem no meio ambiente. Podem sobreviver por meses em amostras clínicas secas, são relativamente resistentes ao calor e podem tolerar uma concentração aumentada de sal<sup>5</sup>.



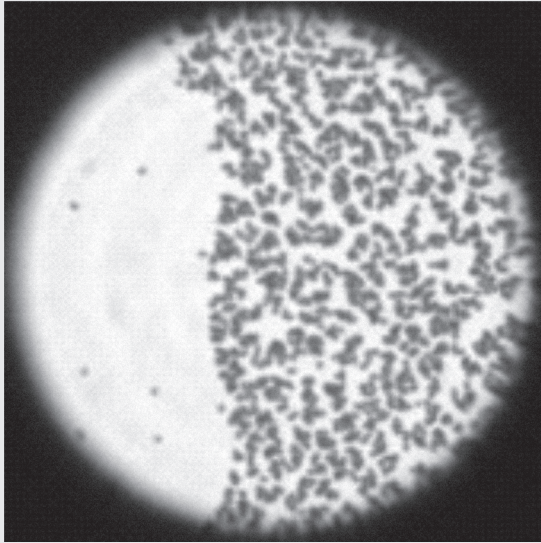


Foto: Elizangela C. P. Donato

**Figura 9:** Característica morfotintorial pela técnica de coloração de Gram de *Staphylococcus* spp.

### 3.2 Quantificação do DNA

Os valores encontrados se encontram na tabela 4:

### 3.3 Identificação Molecular das Bactérias

As informações encontram-se nas Figuras 11, 12 e 13.

### 3.4 Fungos identificados

No decorrer dos 15 dias, em que as placas de Ágar Sabouraud foram mantidas em temperatura ambiente, foi observado o crescimento de 3 colônias fúngicas (colônias filamentosas) antes da desinfecção e nenhuma após.

Os fungos identificados foram: *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium oxalicum* e *Cladosporium sphaerospermum*. Esses fungos foram identificados a partir do plaqueamento antes da

**Tabela 3:** Bactérias identificadas de acordo com as placas.

Numeração das Bactérias Identificadas	Caracterização das colônias bacterianas	Bactérias identificadas
1	Meio 2.2	<i>Bacillus spp</i>
2	Meio 1.2 (colônia branca média)	<i>Enterococcus spp</i>
3	Meio 1.1 (colônia branca)	<i>Enterococcus spp</i>
4	Bactéria referência	<i>Enterococcus faecalis</i>
5	Esquerda abaixo fundo 1 (colônia amarela)	<i>Staphylococcus spp</i>
6	Bactéria referência	<i>Staphylococcus aureus</i>
7	Esquerda abaixo fundo 1 (colônia branca)	<i>Staphylococcus spp</i>
8	Esquerda abaixo fundo 2 (colônia cremosa)	<i>Staphylococcus spp</i>
9	Meio 1.2 (colônia branca pequena)	<i>Staphylococcus spp</i>
10	Esquerda abaixo entrada 1	<i>Staphylococcus spp</i>
11	Direita acima fundo 1 (colônia branca)	<i>Staphylococcus spp</i>
12	Direita acima fundo 2 (colônia cremosa)	<i>Staphylococcus spp</i>
13	Bactéria referência	<i>Bacillus cereus</i>
14	Bactéria referência	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

**Fonte:** Dados da Pesquisa

\*Utilizou-se como ponto de referência para caracterização das placas a porta de entrada da Sala Piloto. Sendo abaixo ao nível do chão, acima ao nível da estante e, no meio em cima do carrinho de manipulação colocado no meio da sala.

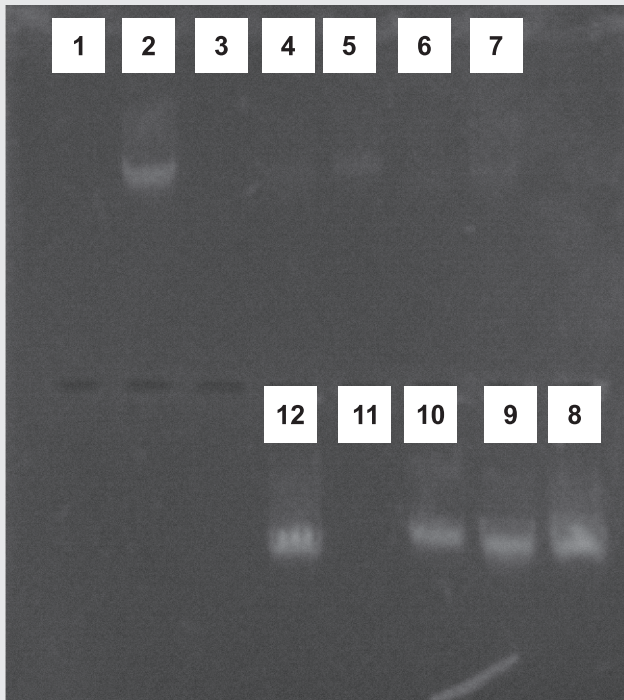


Foto: Elizangela C. P.Donato

**Legenda:** Staf 5= *Staphylococcus* spp, amostra 5; Staf 6=*Staphylococcus aureus*, controle positivo; Ladder (50kb); Staf 7=*Staphylococcus* spp, amostra 7; Staf 8=*Staphylococcus* spp, amostra 8; Staf 9=*Staphylococcus* spp, amostra 9; Staf 10=*Staphylococcus* spp, amostra 10; Staf 11=*Staphylococcus* spp, amostra 11; Staf 12=*Staphylococcus* spp, amostra 12; Staf B= controle negativo.

**Figura 11:** Identificação molecular de *Staphylococcus* spp (1392 pb)

desinfecção, após a desinfecção não houve crescimento de colônias fúngicas.

### 3.4.1 *Penicillium purpurogenum*

Essa espécie de fungo é capaz de produzir pigmentos sobre diferentes velocidades de crescimento. Há ainda escassez no estudo desses pig-

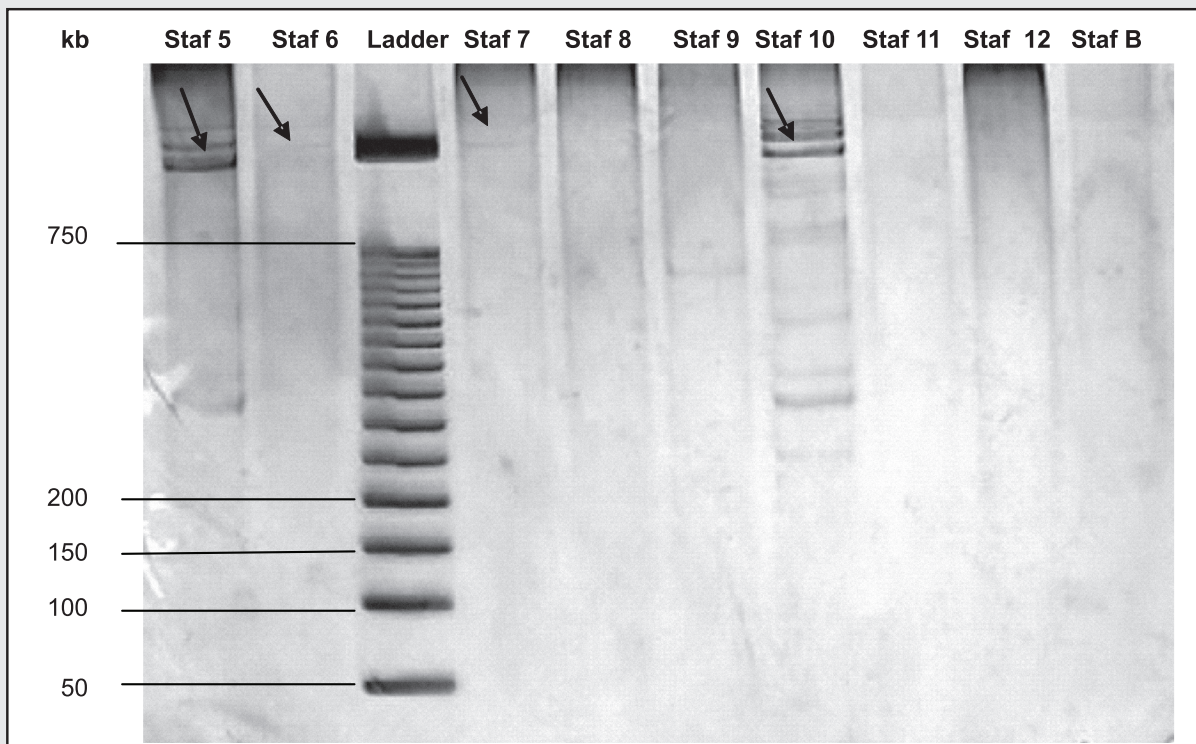


Foto: Elizangela C. P.Donato

**Legenda:** Staf 5= *Staphylococcus* spp, amostra 5; Staf 6= *Staphylococcus aureus*, controle positivo; Ladder (50kb); Staf 7= *Staphylococcus* spp, amostra 7; Staf 8= *Staphylococcus* spp, amostra 8; Staf 9= *Staphylococcus* spp, amostra 9; Staf 10= *Staphylococcus* spp, amostra 10; Staf 11= *Staphylococcus* spp, amostra 11; Staf 12= *Staphylococcus* spp, amostra 12; Staf B = controle negativo.

**Figura 11:** Identificação molecular de *Staphylococcus* spp (1392 pb).

Tabela 4: Quantificação do DNA extraído.

Numeração das Bactérias	Absorbância 260 nm	Ratio	Concentração ug/mL
1	0,041	1,663	61,1
1'	0,044	1,638	66,4
2	0,108	1,386	162,3
3	0,050	1,563	74,7
4	0,120	1,712	180,3
5	0,048	1,651	72,5
6	0,089	1,361	133,9
6'	0,028	1,355	42,2
7	1,131	1,631	96
8	0,423	1,445	635
9	0,301	1,624	51,3
10	0,098	1,456	147
11	0,054	1,44	81,4
11'	0,044	1,366	65,4
12	0,401	1,572	601,4
13	0,660	1,841	989,3
14	0,100	1,525	15,5

Fonte: Dados da Pesquisa

Legenda: 1- *Bacillus spp*; 1'- *Bacillus spp*\*; 2- *Enterococcus spp*; 3- *Enterococcus spp*; 4- *Enterococcus faecalis*\*\*;  
5- *Staphylococcus spp*; 6- *Staphylococcus aureus*\*\*;  
6'- *Staphylococcus aureus*\*, 7- *Staphylococcus spp*; 8- *Staphylococcus spp*;  
9- *Staphylococcus spp*; 10- *Staphylococcus spp*;  
11- *Staphylococcus spp*; 11'- *Staphylococcus spp*; 12- *Staphylococcus spp*;  
13- *Bacillus cereus*\*\*;  
14- *Streptococcus pneumoniae*\*\*;

\*Amostra repetida.

\*\*Bactéria de referência.

mentos produzidos por esse fungo, o que precisa ser revisto<sup>9</sup>.

O gênero *Penicillium* caracteriza-se por formar conídios em uma estrutura ramificada semelhante a um pincel que termina em células conidiógenas chamadas fiálides. As ramificações formam verticilos que servem de critério de identificação e classificação desse gênero<sup>10</sup>.

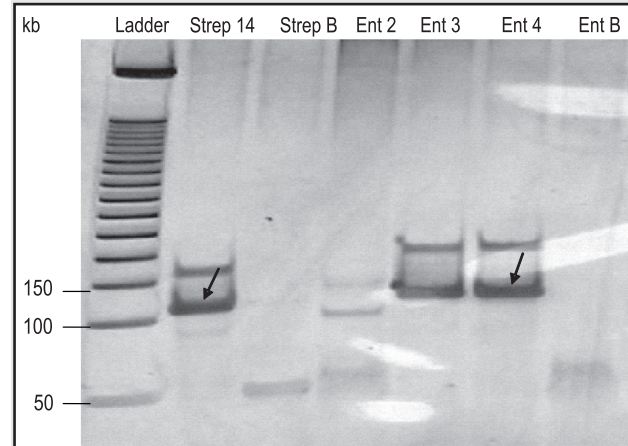


Foto: Elizangela C. P. Donato

Legenda: Ladder (50kb); Strep 14= *Streptococcus pneumoniae*, amostra referência (amplificação dos primers); Strep B= controle negativo; Ent 2= *Enterococcus spp*, amostra 2; Ent 3= *Enterococcus spp*, amostra 3; Ent 4= *Enterococcus faecalis*, controle positivo; Ent B= controle negativo.

Figura 12: Identificação molecular de *Streptococcus spp* (105 pb) e *Enterococcus spp* (112 pb).

### 3.4.2 *Penicillium oxalicum*

A linhagem de fungo *Penicillium oxalicum* é conhecida desde 1915 quando foi isolada, sendo uma linhagem utilizada na agricultura, alimentos e na produção de enzimas. O estudo dos metabólitos secundários desta espécie mostrou uma diversidade química limitada, tendo sido relatados na literatura o ácido secalonico e a oxalina<sup>11</sup>.

### 3.4.3 *Cladosporium sphaerospermum*

Nos cladospórios, o aparelho de conidiação, os conídios se desenvolvem do conidióforo por um processo de brotamento e permanecem unidos por disjuntores que são porções da parede celular que ligam dois conídios de uma cadeia. Os conídios que fazem parte das cadeias ramificadas podem apresentar até três disjuntores. Como o desenvolvimento dos conídios se dá por brotamento, o conídio distal é o mais jovem<sup>12</sup>.

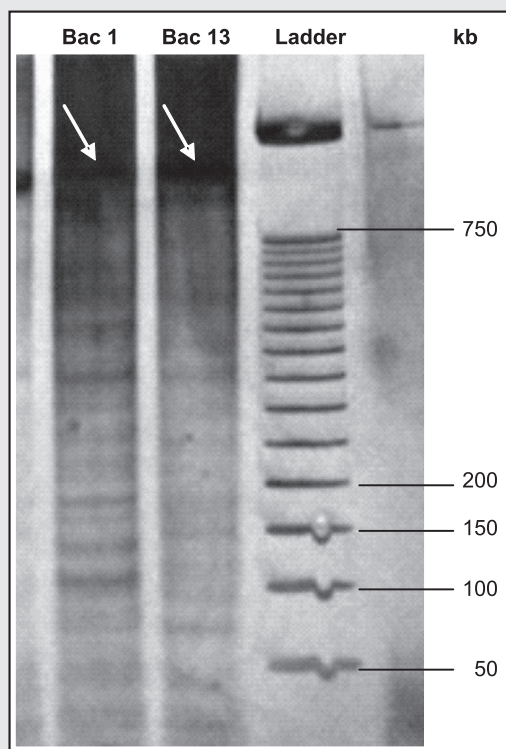


Foto: Elizangela C. P. Donato  
 Legenda: Bac 1= *Bacillus* spp, amostra 1; Bac 13= *Bacillus cereus*, controle positivo; Ladder (50kb).

Figura 13: Identificação molecular de *Bacillus* spp (1300 pb).



Foto: Elizangela C.P. Donato

Figura 14: Colônias do fungo *Penicillium purpurogenum* em Ágar Czapek e MEA.



Foto: Elizangela C.P. Donato

Figura 16: Colônias do fungo *Cladosporium sphaerospermum* em Ágar Czapek e MEA.

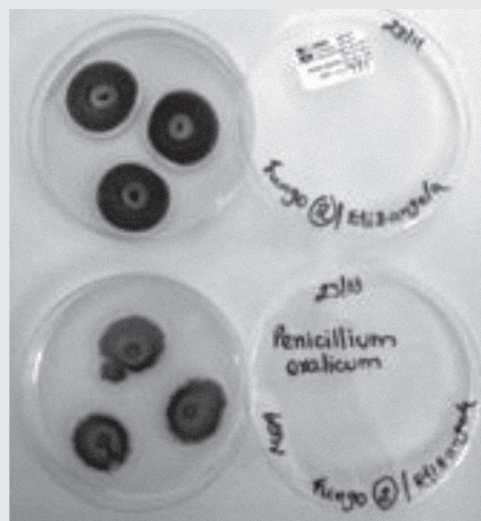


Foto: Elizangela C. P. Donato

Figura 15: Colônias do fungo *Penicillium oxalicum* em Ágar Czapek e MEA.

*Cladosporium sphaerospermum*, conhecido como um dos mais comuns, dispersado pelo ar cosmopolita. Essa espécie de *Cladosporium* foi freqüentemente isolado de ar interior e exterior, residências, e ocasionalmente de humanos e plantas<sup>13</sup>.

De todas as 7 amostras identificadas bioquimicamente como *Staphylococcus* spp, apenas 3 amostras foram identificadas molecularmente como *Staphylococcus* spp. De 1 amostra identificada bioquimicamente como *Bacillus* spp, a mesma foi identificada molecularmente. De 2 amostras identificadas bioquimicamente como *Enterococcus* spp, apenas 1 foi identificada molecularmente do mesmo gênero. Nas amostras identificadas bioquimicamente nenhuma correspondeu ao gênero *Streptococcus* spp.

#### 4 DISCUSSÃO

A identificação bioquímica das bactérias foi limitada à gênero, o que restringiu o trabalho. Mas abre precedente à continuação do trabalho para que, em monitoramentos ambientais futuros, estabeleçam-se mais meios de cultura específicos que permitam o aprofundamento na identificação bacteriana.

A identificação molecular pode mostrar que mais provas bioquímicas podem ser empregadas na identificação de algumas bactérias estudadas neste trabalho. No caso de *Staphylococcus* spp, das 7 amostras identificadas bioquimicamente, apenas 3 corresponderam na identificação molecular. Isso demonstra a carência de mais provas que possam validar a identificação bacteriana. Neste trabalho foram utilizadas apenas as provas da catalase, Dnase e ágar manitol salgado. O mesmo aconteceu com o *Enterococcus* spp, pois das 2 amostras identificadas bioquimicamente, apenas 1 correspondeu molecularmente. O *Bacillus* spp identificado bioquimicamente em uma das amostras teve correspondência na identificação molecular. Mas de uma maneira geral, pode-se con-

siderar os resultados satisfatórios, pois a metade das identificações bioquímicas corresponderam à identificação molecular, mostrando a sensibilidade da técnica de PCR.

Em relação aos fungos identificados bioquimicamente, não foi possível a identificação molecular, pois as culturas primárias se contaminaram inviabilizando o processo de extração de DNA e PCR, mas a identificação bioquímica permitiu a identificação à nível de espécie.

Foram encontradas as seguintes espécies fúngicas na identificação bioquímica: *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium oxalicum* e *Cladosporium sphaerospermum*. Esses microrganismos fazem parte de um grupo conhecido como anemófilos, ou seja, fungos do ar.

Os fungos dispersados através do ar atmosférico são denominados fungos anemófilos. Sendo assim, a microbiota fúngica anemófila pode ser semelhante ou diferente em cada cidade ou região. Os elementos fúngicos que são encontrados no ar atmosférico são os esporos (propágulos). São aeroalérgenos que, quando inalados, podem ser responsáveis por manifestações respiratórias alérgicas, como asma e rinite<sup>18</sup>.

Existe grande variedade de alérgenos potencialmente responsáveis pela sensibilização e desencadeamento de “crises alérgicas” em indivíduos atópicos, além dos fungos. Pólenes, epitélios de animais, poeira doméstica, antígenos ocupacionais, poluentes químicos e outros são alguns exemplos<sup>19</sup>.

Os fungos anemófilos pertencem a diversos gêneros e espécies e quase todos são contaminantes, isto é, podem ser isolados facilmente do ar, utilizando-se meios de cultura adequados. Numerosos métodos foram propostos para o estudo da microbiota fúngica do ar. O processo mais empregado consiste em expor placas de ágar Sabouraud durante 15 a 30 minutos em determinados ambientes, com posterior identificação das colônias dos fungos que se desenvolverem<sup>20</sup>.

Além dos fungos encontrados, outros gêneros fazem parte deste grupo, como o *Aspergillus*. Os fungos encontrados nos remetem a maiores cuidados, principalmente no uso adequado dos EPI'S

e padronização de rotina de desinfecção das áreas controladas sejam respeitadas, para que alergias não se desenvolvam e os profissionais não sejam prejudicados nesse ambiente.

## 5 CONCLUSÃO

De acordo com o trabalho apresentado, a desinfecção realizada no Biotério pode ser considerada eficaz, pois houve crescimento de colônias fúngicas antes da desinfecção e, nenhum crescimento após a 2ª desinfecção de paredes, tetos e chão. É possível também estabelecer uma diminuição na incidência de colônias bacterianas após desinfecção. De um total de 8 colônias antes da desinfecção houve a redução de metade desse crescimento. Isso é importante no que se refere ao que já é realizado no Biotério e, permite comprovar a eficácia do processo de desinfecção do Biotério, valorizando as barreiras sanitárias já existentes.

Este trabalho permitiu a análise das espécies bacterianas e fúngicas encontradas na sala Piloto (colônia de fundação) do Biotério da Funed. Os fungos encontrados são anemófilos. Esses fungos estão dispersos no ar, podendo provocar alergias no ser humano. Essas alergias podem ser mais recorrentes em ambientes fechados, mas nada que possa influir patogenicamente na criação dos animais do Biotério. As bactérias identificadas não correspondem à grande variedade de espécies bacterianas, como o *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*, responsáveis por infecções ou patogenias nos animais, comprovando mais uma vez a eficiência das barreiras sanitárias adotadas. Apesar de ter sido identificado o gênero *Staphylococcus* spp, foi descartado que este poderia ser da espécie *Staphylococcus aureus*, já que os testes de Dnase foram todos negativos.

A identificação bioquímica das bactérias da maioria da amostras correspondeu à identificação molecular. Isso permite assegurar que a falta de meios de cultura mais específicos devem ser utilizados em monitoramentos ambientais futuros para que a identificação bioquímica das bactérias à nível de espécie seja possível, possibilitando maior segurança nos resultados.

Para que se desenvolva um trabalho de controle da saúde animal é necessário padronizar processos (a saúde animal influi em processos experimentais e tende a ser melhor observada, para que os mesmos não sejam retrógrados). Com o monitoramento ambiental será possível estabelecer uma rotina eficaz do controle de microrganismos no ambiente escolhido e evidenciar as barreiras sanitárias eficazes. Aliado à outros controles como o parasitológico e bacteriológico (em vias de implantação), o monitoramento ambiental manterá assegurada a saúde animal no Biotério de criação da Funed.

## 6 AGRADECIMENTOS

Ao incentivo e financiamento da FAPEMIG nos treinamentos técnico-científicos, que me permitiu agregar conhecimentos que possibilitaram desenvolver este trabalho, ao Serviço de Micologia e Micotoxinas da FUNED (Mabel), ao Serviço de Microbiologia de Alimentos da FUNED (Milton), Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas da FUNED (Carlene, Marluce, Simone e Elaine), ao Serviço de Microbiologia da FUNED (Vírginia, Ana Cláudia e Ana Maria) e ao Serviço de Biotecnologia e Saúde da FUNED (Sérgio, Bruno e Cláudio).

# ENVIRONMENTAL MONITORING IN THE ANIMAL HOUSE

Animals raised in a biotherium ensure the quality of biological experiments in order to improve the quality of human life. Experiments are being tested in alternative methodologies in order to minimize the amount of animal used in consideration of ethical issues. The field of study of this work is biotherium at Funed the mice bred of the Swiss Webster strain, the overall goal being the improvement of animal quality control has already been done. The environmental monitoring proposed by this work contributes to minimize the entry of microorganisms utilizing more efficient sanitary barriers. Also, monitoring the ambient of the pilot room (foundation colony). The methodology used was the plating area, with 20 minutes of exposure. Identifications of bacterial colonies were performed which grew after 48 hours incubation at 35°C, through biochemical and morphological characteristics in Gram stain. A second molecular identification was performed using specific primers. Fungal colonies were also observed in growth after incubation at room temperature, and then. This work allowed the observation of the effectiveness of the disinfection of the biotherium with significantly reducing the number of microorganisms, as well as evaluating the importance of monitoring animal health and its relevance in the pursuit of high standards in producing desired health of animals used in scientific research.

**Keywords:** Laboratory animals. Microbiology. Environmental monitoring. Molecular biology.

ABSTRACT

1. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2006.
2. Lapchik VB, Matarraia VGM, Ko GM. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. São Paulo: Atheneu; 2009.
3. Jaigobind AG, Amaral L, Jaisingh S. Dossiê Técnico- Desinfetantes Domésticos. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT, 2007. [citado 7 jan.2012]. Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br>.
4. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 2005.
5. ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica, Módulo V, 2005. [Citado 25 jan.2012]. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/...>

6. ANVISA. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica, Módulo VII, 2004. [citado 25 jan.2012]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod\\_7\\_20...](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_20...)
7. Pitt JI, Hocking AD. Methods for isolation, enumeration and identification. In: Fungi and Food Spoilage. 2ª edição. Maryland: Aspen; 1999. p.21-57.
8. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. Introduction to Food and Airborne Fungi. 7ª edição. Netherlands: Centralbureau voor Schimmelcultures; 2004.
9. Mendes-Zavala A, Contreras-Esquivel JC, Lara-Victoriano F,

Rodriguez-Herrera R, Aguilar CN. Producción fungica de un pigmento rojo empleando la cepa xerofílica *Penicillium purpurogenum* GH-2. Rev Mex Ing Quím. 2007; 6(3): 267-73.

10. Carrillo L. Los hongos de los alimentos y forrajes 2003. [citado 31 maio 2012]. Disponível em: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm..>

11. Pimenta EF, Selegim MHR, Tininis AG, Berlinck RGS. Otimização da produção de oxalina pela linhagem de *Penicillium oxalicum* isolada de ambiente marinho. Sociedade Brasileira de Química, 2004. [citado 31 maio 2012]. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T0930-1.pdf>.

12. Trabulsi LR, Silva NP, Toledo MRF. Microbiologia. Rio de Janeiro/São Paulo: Atheneu, 1991.

REFERÊNCIAS

13. Zalar P, Hoog GS, Schroers HJ, Crous PW, Groenewald JZ, Gunde-Cimerman N. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology* 58: 157-183, 2007. [citado 31 maio 2012]. Disponível em: <http://www.cbs.knaw.nl/publications/1058/06%20Phylogeny%20and%20ecology%20of%20the%20ubiquitous%20saprobe%20Cladosporium%20sphaerospermum,with%20descriptions%20of%20seven%20new%20species%20from%20hypersaline%20environments.pdf>.
14. Garbeva P, Van Veen JA, Van Elsas JD. Predominant *Bacillus* spp. in Agricultural Soil under Different Management Regimes Detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*, 2003. [citado 07 jan. 2012]. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12632212](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12632212).
15. Araújo TF. Caracterização e Identificação de *Enterococcus* spp isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo minas artesanal da região da serra da canastra, Minas Gerais (dissertação). Minas Gerais (MG): Universidade Federal de Viçosa, 2008. [citado 30 maio 2012]. Disponível em: [www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde\\_busca/processaArquivo.php?...](http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_busca/processaArquivo.php?...)
16. Delbe's C, Montel MC. Design and application of a *Staphylococcus*-specific single strand conformation polymorphism-PCR analysis to monitor *Staphylococcus* populations diversity and dynamics during production of raw milk cheese. *Lett Appl Microbiology*. 2005; 41:169-74.
17. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG*. 2002; 109:527-33. [citado 30 maio 2012]. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0528.2002.01349.x/full>
18. Mezzari A, Perin C, Santos Júnior AS, Bernd LAG, Di Gesu G. Os fungos anemófilos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre-RS. *Rev Assoc Med Bras*. 2003;49(3). [citado 26 maio 2012]. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302003000300030](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302003000300030).
19. Menezes EA, Alcanfor AC, Cunha FA. Fungos anemófilos na sala de periódicos da biblioteca de ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará. *RBAC*. 2006; 38 (3): 155-8.[citado 26 maio 2012]. Disponível em: [http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac\\_38\\_03/rbac3803\\_05.pdf](http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_38_03/rbac3803_05.pdf).
20. Flores LH, Onofre SB. Determinação da presença de fungos anemófilos e leveduras em unidade de saúde da cidade de São Francisco Beltrão-PR. *SaBios: Rev Saúde Biol*. 2010; 5(2):22-6. [citado 26 maio 2012]. Disponível em: <http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/viewArticle/670>.



# ESTUDO DA HIERARQUIA DE CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER ATRAVÉS DO USO DE SISTEMAS COM GAIOLAS INTERLIGADAS (SGI)

Maria Alice do Amaral Kuzel<sup>1</sup>  
Fernanda da Silva Oliveira<sup>1</sup>  
Kelly Cristina Demarque<sup>1</sup>  
Janaína Alves Rangel<sup>1</sup>  
Frederico Villas Boas Rodrigues<sup>1</sup>  
Wanderson Silva Batista<sup>1</sup>  
Lucas dos Santos Gameiro<sup>2</sup>  
Gabriel Melo de Oliveira<sup>1</sup>

1. Laboratório de Biologia Celular – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro;
2. Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Biofilmes – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro.

Autor para correspondência:  
Gabriel Melo de Oliveira  
E-mail: gmoliveira@ioc.fiocruz.br

Recebido para publicação: 30 de julho de 2013  
Aceito para publicação: 05 de agosto de 2013

O camundongo em biotério é um animal social, agressivo e extremamente territorialista. As relações entre o indivíduo e o grupo assim como sua busca em acesso a reprodução e alimento promove a estruturação de uma ordem hierárquica. Esta hierarquia é classicamente associada a quem agride (dominante) e quem é agredido (subordinado). Através do uso do sistema de gaiolas interligadas (SGI), buscamos esclarecer a dinâmica desta estrutura e a posição do indivíduo dependendo do momento. Além disso, também podemos verificar as relações de afinidade entre os indivíduos e a caracterização do indivíduo em relação ao perfil de dominância/subordinação. Nossos resultados demonstram que os camundongos da linhagem Swiss Webster em biotério são capazes de formar relações de afinidade (fraternais) quando agrupados jovens e preferindo ficar entre seus semelhantes quando reagrupados na idade adulta. A dominância é realizada por apenas um indivíduo e sugerimos que o objetivo desta atitude seja o acesso exclusivo a uma determinada área e possivelmente ao alimento e acasalamento. Quando dividimos em duas categorias, o dominante protege seus semelhantes e agride prevalentemente os indivíduos da categoria contrária. Os subordinados podem variar entre os que buscam a dominância (disputantes) e os indivíduos que buscam não se envolver nos episódios agressivos (neutros). Há um indivíduo que sofre até 90% das atitudes agressivas do dominante, chamamos esta categoria como “subordinado alvo”.

**Palavras-chave:** Camundongos. Biotério. Hierarquia e Comportamento Agressivo.

## 1 INTRODUÇÃO

Camundongos utilizados em investigações biomédicas são mamíferos da família *Muridae*, subfamília *Murinae*, ordem *Rodentia* e gênero *Mus*. Seu

nome científico é *Mus musculus*<sup>1</sup>. São acasalados, mantidos e utilizados conforme seu *status* genético. Basicamente, são divididas em consanguíneas (*inbred*) e não consanguíneas (*outbred*)<sup>2</sup>. A partir desta divisão é desenvolvida uma enorme quantidade de linhagens com diferentes características

RESUMO

genotípicas e fenotípicas. Apresenta um corpo pequeno e fusiforme, metabolismo acelerado, com batimentos cardíacos em torno de 600 a 700 por minuto e aproximadamente 160 movimentos respiratórios por minuto. Possuem a temperatura corporal mantida entre 35,2 a 37,9°C e seu controle térmico corporal é realizado principalmente pela ingestão de água<sup>1,2,3</sup>. No que diz respeito ao comportamento individual, apesar de serem da mesma espécie, existe um perfil comportamental diferente entre as linhagens, idades e mesmo entre os grupos da mesma linhagem<sup>4</sup>. Sua expectativa de vida média é de dois anos, chegando a alguns casos de até quatro anos<sup>1,2</sup>.

A hierarquia é definida como a ordenação de elementos por ordem de importância. Em humanos, há uma hierarquia social nomeada, descrito pela organização da família, tribo ou clã, organização do trabalho, política, etc.<sup>5</sup> Em camundongos alojados pode observar a chamada hierarquia de dominância<sup>6</sup>. Este tipo pode ser definido como um sistema organizado de indivíduos no grupo, determinado por competição<sup>6,7</sup>. Ele também pode ser dividido em: linear, sem agressividade ou despótica, com intensidade variável de agressividade<sup>8</sup>.

Há uma estreita relação entre a hierarquia de dominância e a teoria da seleção sexual<sup>6,9</sup>. Animais sociais como os primatas não-humanos, algumas espécies de aves e peixes mostram que os indivíduos dominantes submetem seus subordinados a restrição de espaço (territorialidade), a alimentação e a possibilidade de acasalamento<sup>10</sup>. Em consequência disto, obtêm sucesso reprodutivo por aumentar a probabilidade de frequência de seus coitos e possuir mais recursos para investir na sobrevivência de sua prole. Schjelderup-Ebbe<sup>11</sup> que descreveu o estabelecimento de uma hierarquia de dominância em camundongos relatou a alta agressividade deste modelo no estabelecimento das posições hierárquicas clássicas: dominante e subordinado. Segundo este autor, a agressividade pode ser estimulada por fatores externos, como por exemplo, a queda na temperatura ou escassez de alimento, mas, por vezes, não é possível observar uma causa definida (exceto no acasalamento)<sup>11</sup>.

Apesar de serem da mesma espécie, conforme resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, também há diferenças no comportamento agressivo/dominância entre as linhagens mantidas em biotério (dados não publicados). Camundongos Swiss Webster, machos e adultos foram altamente intolerantes uns com os outros, principalmente durante a demarcação de territórios, promovendo então alta intensidade de agressividade. A linhagem BALB/c demonstrou menor agressividade e uma melhor capacidade de organizar seus grupos (quando não havia presença de fêmeas). Os camundongos C57Bl/6 aparentemente demonstram incapacidade de organização hierárquica e reduzidos eventos agressivos<sup>12</sup>.

Os fatores que determinam as posições sociais de dominante/subordinado não estão completamente esclarecidos. Diversos autores sugerem que fatores como a condição fisiológica ou de saúde, a capacidade para agredir/defender e a experiência anterior (aprendizagem) são importantes para esta estrutura de hierarquia<sup>6,13,14</sup>. Hilakivi et al. observaram diferenças hormonais e neuroquímicas comportamentais em camundongos dominantes e subordinados. Camundongos subordinados apresentavam níveis mais elevados de serotonina no hipotálamo, hipocampo e no tronco cerebral quando comparados com o dominante. Por outro lado, os camundongos dominantes reduziram as concentrações de dopamina no tronco cerebral<sup>15,16</sup> e de corticosteróide sistêmico (dados não publicados).

Nosso grupo de pesquisa implementou o Modelo de Agressividade Espontânea (MEA) baseado no agrupamento/reagrupamento dos mesmos animais observados desde a sua juventude até a idade adulta<sup>17</sup>. Acrescentamos a este modelo o Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI). Buscamos através deste sistema, manter em agrupamento dois grupos diferentes (quando jovens) e reagrupados na idade adulta e área exclusiva para cada grupo e possibilidade de fuga para os indivíduos. Então nosso objetivo neste trabalho é decrever as características comportamentais da estruturação hierárquica de camundongos em biotério e também caracterizar o comportamento dos indivíduos

em uma posição social dentro do grupo de animais através do uso do SGI.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

*Animais:* Requisitamos ao Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL/FIOCRUZ) para cada ensaio (n=3) 50 camundongos da linhagem Swiss Webster, machos com três semanas de vida. Recebemos estes animais no Setor de Experimentação Animal dos Laboratórios de Biologia Celular e Inovações em Terapias, Ensino e Biofilmes do Instituto Oswaldo Cruz (SEA LBC/LITEB) e adaptamos estes animais ao novo ambiente por uma semana. Esta adaptação foi realizada em estantes ventiladas com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados segundo aos padrões e normatizações ambientais vigentes. Foi oferecida água e ração a vontade e a rotina de higienização foi realizada duas vezes por semana. Os procedimentos desse projeto foram realizados sob licença número LW-5/12 da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ).

### Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI)

Na 3ª semana de vida agrupamos os animais em duas diferentes categorias: Amarelos (Am1 a 5) e Azuis (Az1 a 5) com 5 animais cada gaiolas (Figura 1). Utilizamos marcação temporária de *Boun* para a coloração amarela e *Violeta* de genenciana para a coloração azul. A identificação individual deveu-se a respectiva parte do corpo colorida de forma a individualizar os animais entre c1 e c5. Estruturamos o SGI através da ligação entre três gaiolas por conexões hidráulicas de PVC no tamanho a permitir a passagem de um camundongo adulto. Estas gaiolas foram divididas entre área 1 (A1), área 2 (A2) e área 3 (A3). Estes SGI foram divididos entre Sistema 1 ao 5 (S1 ao S5) onde receberam os animais, na 10ª semana de vida, na respectiva ordem, S1: grupos Am1 e Az1 (n=10);

S2: grupos Am2 e Az2; S3: grupos Am3 e Az3; S4: grupos Am4 e Az4 e S5: grupos Am5 e Az5. Realizaram-se na 12ª, 14ª e 16ª semana de vida os parâmetros comportamentais, teste de força muscular e peso corporal.

### Testes comportamentais

*Etograma:* Realizamos a filmagem (vista superior) nos agrupamentos (4ª, 6ª e 8ª semana de vida) e posteriormente nos reagrupamentos (12ª, 14ª e 16ª semana de vida) de cada grupo por 60 minutos contínuos através de uma câmera Canon PowerShot SX20 IS® (Lake Success, NY - EUA). Conseguimos um total de 3.600 minutos de gravação para cada ensaio e registramos por fotografia as alterações mais representativas de cada grupo. A partir destas filmagens determinamos os quesitos avaliados em nosso etograma: a) identificação de dominante/subordinado; b) quantificação do número de ataques em cada animal; c) tempo de permanência de cada animal nas respectivas áreas do SGI; d) percentual dos indivíduos de cada categoria nas respectivas áreas (comparando entre 1 e 24 horas após a limpeza da gaiola); e) identificação do padrão de comportamento agressivo (PCA), como mordidas, ferimentos e lesões ocasionadas por lutas nos indivíduos de cada grupo; g) intensidade do PCA de 1 a 4+ correspondente a cada grupo e a cada indivíduo. Determinamos que o escore zero (0) está relacionado aos grupos com a ausência e/ou presença de vocalizações e perseguições, contudo, não apresentavam sinais de mordidas ou lesões no corpo do animal. O escore de uma cruz (1+) a presença de eventos agressivos reduzidos, com ou sem caráter sexual (tentativa de coito entre os indivíduos) e a presença de pequenas mordidas ou ferimentos em algum lugar do corpo do animal. Para o escore duas cruces (2+) para os grupos, correlacionamos a presença de reduzidos eventos agressivos sem caráter sexual e discretos sinais de mordidas na região da cauda, dorso ou bolsa escrotal dos indivíduos. O escore três cruces (3+) está relacionado a presença de eventos agressivos

moderados no grupo (com ou sem especificidade entre os indivíduos) e a observação de ferimentos e lesões moderadas na cauda, dorso e bolsa escrotal nos animais. O escore quatro cruces (4+) alta frequência (ou intensidade) de eventos agressivos (com ou sem especificidade entre os indivíduos) e a presença de marcantes de lesões e ferimentos na cauda, dorso e bolsa escrotal. Em alguns casos, os ferimentos podem ocorrer com intensidades variáveis, em outros pontos do corpo como tórax, abdome e patas dianteiras. Fotografamos todos os sistemas a cada limpeza de gaiola.

### Teste de força muscular

Neste teste utilizamos o aparelho *grip metter force* (Insight Inds, SP, Brasil) é constituído por uma pequena grade de arame (8×8 cm) ligada a um transdutor de força isométrica (dinamômetro). Este teste consistiu na colocação do animal pelas patas dianteiras na pequena grade puxando pela cauda suavemente para trás para medir a força máxima exercida pelo camundongo antes de perder aderência. A média das três medidas para cada animal foi calculada e expressa em Newtons (N).

### Peso corporal e consumo de alimento

Avaliamos na 12<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> semana de vida o peso corporal de cada animal através do uso de uma balança analítica (REF) e calculamos o ganho (ou perda) de peso entre as semanas estudadas para cada animal. Nos mesmos períodos descritos acima, calculamos o percentual de consumo de ração, pela diferença entre a quantidade colocada e consumida após 72 horas nas respectivas áreas (A1 a A3).

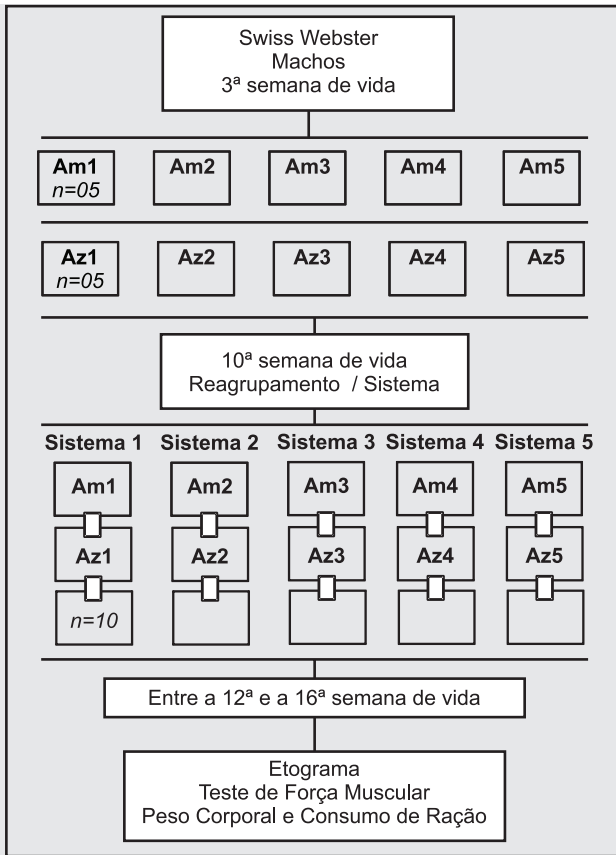
Para podermos analisar e ilustrar estes resultados, selecionamos dois sistemas com os resultados mais representativos para o esclarecimento de nossa hipótese científica.

O primeiro quesito estudado foi a incidência da categoria de camundongos (amarelos e azuis) em ficarem juntos entre os seus semelhantes, após a limpeza da gaiola. No S1 (Fig. 1) observamos na 12<sup>a</sup> (A), 14<sup>a</sup> (B) e 16<sup>a</sup> semana de vida (C) o percentual de animais amarelos e azuis (Am/Az) nas áreas A1, A2 e A3 do sistema. Na primeira hora de filmagem após a limpeza da gaiola, os animais de ambas as categorias misturam-se e não há uma preferência claramente observável. Por exemplo: na 12<sup>a</sup> semana de vida, os Am estão em 40% na A1 e 60% na A2. 100% dos Az encontravam-se na A3. Na 14<sup>a</sup> semana de vida, observamos na A1 20% de Am e 20% de Am. Na A2 houve a preferência de 60% de Am e 20% de Az, assim como na A3 com 20% de Am e 60% de Az. Na 16<sup>a</sup> semana de vida, observamos novamente o padrão de 40% de Am estão na A1 e 60% na A2. Enquanto que 100% de Az mantiveram-se na A3. No S5 (Fig. 2) na 12<sup>a</sup> (A), 14<sup>a</sup> (B) e 16<sup>a</sup> semana de vida (C) também descrevemos o percentual de animais amarelos e azuis (Am/Az) nas áreas A1, A2 e A3 do sistema. Os resultados foram semelhantes ao sistema anterior, onde 1h após a limpeza das caixas os animais misturam-se entre as categorias, independentemente da idade. Na 12<sup>a</sup> semana de vida, 20% do Am encontravam-se na A1, 60% na A2 e 20% na A3. Cerca de 100% dos azuis estavam na A3. Na 14<sup>a</sup> semana de vida, 100% de Am estavam na A3 e para os Az 60% na A2 e 20% na A3. Na 16<sup>a</sup> semana de vida 100% do Am encontravam-se na A3. Além disso, 60% dos Az estavam na A1, 20% na A2 e 20% na A3.

Buscamos estruturar uma hierarquia a partir da correlação entre número de ataques promovidos/sofridos (Atq) em 60 minutos, padrão de comportamento agressivo (PCA), peso corporal (PC) e ganho de peso (GP) entre as semanas e força muscular (Grip). Estabelecemos um critério de prioridade relacionado ao Atq e PCA, determinando o primariamente o dominante e o subordinado para o sistema 1 (Fig. 3). Esta classificação foi realizada

## 4 RESULTADOS

Dentre os cinco sistemas avaliados, obtivemos um grande e complexo conjunto de resultados.



**Figura 1: Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI):** Estruturamos este sistema a partir do agrupamento de camundongos com 3 semanas de vida em grupos separados ( $n=5$ ) identificados de amarelo (Am1 a Am5) e azul (Az1 a Az5) por uma marcação temporária. Cada animal também foi identificado individualmente entre c1 a c5 pela posição colorida no corpo. Na 10ª semana de vida, realizamos o reagrupamento dos animais no SGI colocando nos sistemas: S1 (Am1 e Az1), S2 (Am2 e Az2), S3 (Am3 e Az3), S4 (Am4 e Az4) e S5 (Am5 e Az5). Na 12ª, 14ª e 16ª semana de vida realizamos em cada animal o etograma, teste de força muscular, peso corporal e consumo de ração.

nas 12ª (A), 14ª (B) e 16ª (C) semana de vida. O S1, na 12ª semana de vida, apresentou o C3Am como dominante, promovendo 10 episódios de

**Figura 2**

	%	%	%
<b>A</b>			
1h	38/22	30/40	30/37
24h	40/00	60/00	00/100
<b>B</b>			
1h	30/10	24/42	44/50
24h	20/20	60/20	20/60
<b>C</b>			
1h	38/22	38/22	38/22
24h	40/00	60/00	00/100
	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>

**Figura 3**

	%	%	%
<b>A</b>			
1h	06/34	14/16	78/50
24h	20/00	60/00	20/100
<b>B</b>			
1h	40/60	40/20	20/20
24h	00/20	00/60	100/20
<b>C</b>			
1h	20/00	00/40	80/60
24h	00/60	00/20	100/20
	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>

**Figura 2 e 3: Permanência dos animais por área do sistema:** Calculamos após 1 e 24 horas da limpeza da gaiola o percentual (%) de permanência dos indivíduos de cada categoria nas respectivas áreas do sistema (A1, A2 e A3). Realizamos este cálculo na 12ª (A), 14ª (B) e 16ª (C) semana de vida e comparamos os sistemas S1 (Fig. 2) e S5 (Fig. 3). Representamos o percentual na proporção entre Am/Az para cada área.

ataques em 60 min. Nenhum dos demais membros da categoria Am receberam algum tipo de agressividade. Na categoria Az, todos receberam: 1 episódio para o C5 e C2Az e 4 episódios para o C3 e C1Az. Curiosamente, o C4Az foi o único da categoria contrária ao dominante que não recebeu nenhuma atitude agressiva. Não observamos nenhuma alteração significativa ou correlação entre a dominância e os outros quesitos como PCA, PC e GRIP. Em relação ao GP, observamos que o dominante demonstrava perda de peso (-1.8g) assim como os subordinados C2Az (-1.1g); C3Az (-0.3g) e C1Az (-3.1g). Na 14ª semana de vida houve uma inversão da dominância estabelecida. O C1Az promoveu 14 ataques/60 min, nos quais cerca de 12 foram somente no C3Am. Estes ataques apresentaram características mais violentas, com PCA de 1 para o C4Az, C1 e C5Am. Para o C3Am os ataques atingiram PCA com escore 2. Novamente não observamos nenhuma alteração significativa ou correlação entre a dominância e os outros quesitos como PCA, PC e Grip e apenas o dominante (C1Az) apresentou perda de peso (-1.9g) quando comparado com os outros indivíduos. Na 16ª semana de vida a dominância de C1Az foi mantida, com uma agressividade menor, apenas 4 ataques/60 min e ainda prevalecendo a agressividade para o C3Am (3 episódios) e C1Am (1 episódio). Neste momento, é a primeira vez que observamos ganho de peso no dominante (0.8g) e vários outros animais demonstraram perda de peso: C2Am (-0.1g); C3Az (-3.5g); C4Am (-3.7g); C1Am (-0.3g) e C3Am (-2.0g). Não observamos nenhuma alteração significativa ou correlação entre a dominância e os outros quesitos como PCA, PC e Grip. No sistema 5 (Fig. 4), os dados diferenciaram-se do anterior por uma falta de estabilidade e uniformidade na dominância. Além disso, destacamos uma maior agressividade do dominante e dos disputantes a dominância. Na 12ª semana de vida, o C2Az promoveu 33 episódios de ataques distribuídos a todos os outros componentes, independentemente da categoria. Além disso, o PCA foi de 1 para C3Az e C3Am; PCA 2 para C1Az, C1Am e C2Am. Apenas o C3Az (1.2g) e o C1Az (1.0g) demonstraram ganho de peso entre as

semanas. Há uma mudança na dominância deste grupo na 14ª semana de vida. O C3Az promove 18 episódios agressivos distribuídos por todos os outros componentes. O C4Az também promove 2 ataques e o C4Az promove 2 episódios e sofre 1. Apenas o C3Az, C2Az e o C5Az não apresentaram PCA (0). Em relação ao ganho de peso, todos os animais apresentaram ganho em seu peso, a exceção de C2Az que perdeu 1.4g. Na 16ª semana de vida, há um aumento da agressividade promovida pelo dominante, promovendo 40 episódios de agressividade e sofrendo 4 ataques em 60 min. O C4Az promoveu 23 episódios e sofreu 6. O C2Az promoveu 12 e sofreu 4. Todos os outros apenas sofreram os ataques. O PCA elevou em diversos animais para 2 e 3. Apenas o C2Az (1.8g) e o C1Az (2.7g) não tiveram perda de peso. Não observamos, em nenhuma das idades estudadas, nenhuma alteração significativa ou correlação entre a dominância e os outros quesitos como PCA, PC e Grip.

Na figura 5 (S1) e 6 (S5) correlacionamos a presença e o tempo de permanência do dominante (min) e o percentual do consumo de ração nas respectivas áreas do sistema. Em relação ao S1, na 12ª semana de vida, o dominante (C3Am) permaneceu mais tempo na A1 (25 min), porém o maior consumo de ração na área 3 (60.6%). Na 14ª semana de vida, o C1Az torna-se dominante e permanece mais tempo (22 min) na Área 2, mantendo o maior percentual de consumo de ração na Área 3 (48.3%). A manutenção do C1Az na dominância demonstra na 16ª semana de vida uma divisão no tempo de permanência, 24 minutos na Área 1 e 22 minutos na Área 3. Curiosamente, observamos uma relação entre os resíduos encontrados nas gaiolas e a permanência do dominante das áreas. As áreas de escolha do dominante são mais limpas do que as outras áreas, indicando que, em geral, este animal demarca seu território e os demais componentes do grupo são destinados para permanecerem nas outras áreas. Não observamos a reprodutibilidade dos resultados acima descritos para o S5. Na 12ª semana de vida, a dominância do C2Az demonstra maior permanência de um grande número de

Figura 4

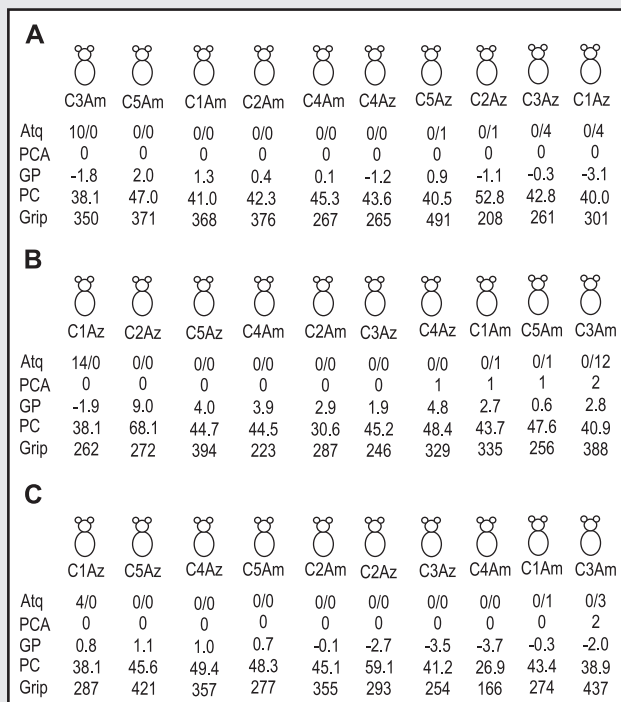
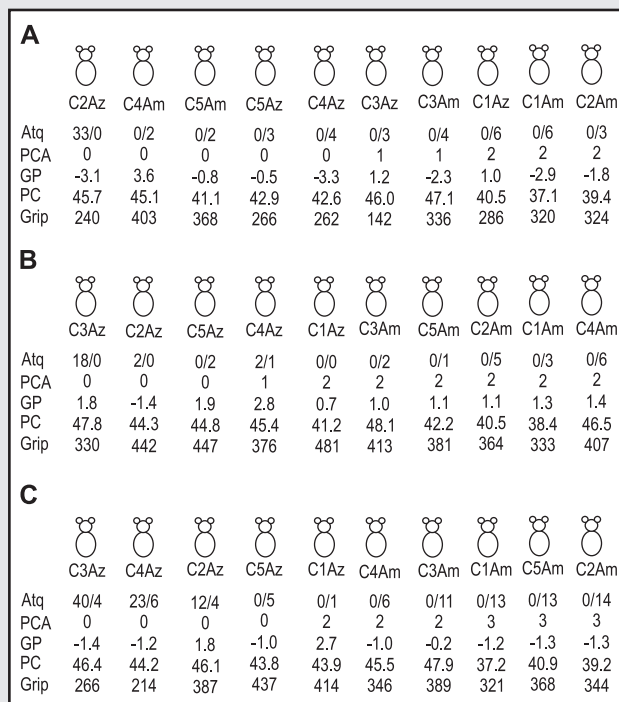


Figura 5



**Figura 4 e 5: Estrutura e dinâmica de hierarquia:** Na 12<sup>a</sup> (A), 14<sup>a</sup> (B) e 16<sup>a</sup> (C) semana de vida esquematizamos a estrutura de hierarquia para os sistemas S1 (Fig. 4) e S5 (Fig. 5). Este esquema segue a ordem de prioridade para os quesitos: Atq, número de ataques promovidos em comparação ao número de ataques sofridos (Ataque/Atacado). PCA, padrão de comportamento agressivo de 0 a 4+ onde os animais que sofrem mais ataques e mais machucados ocupam as posições mais inferiores da escala social. GP, cálculo do ganho de peso entre as semanas e PC peso corporal em cada semana estudada (gramas). Grip, valor da força muscular medida pela resistência do animal em prender-se a grade e expressa em Newton (N).

indivíduos na Área 3, corroborando com o maior consumo de ração (44.3%). Porém o dominante permanece tanto na Área 1 (20 min) quanto na Área 2 (26 min). Na 14<sup>a</sup> e na 16<sup>a</sup> semana de vida, com a presença de dominantes/disputantes não conseguimos determinar exatamente quem é o dominante e qual a área de preferência deste. Porém, observamos que o consumo de ração é mais prevalente na Área 3 (55.6% na 14<sup>a</sup> e 55.3% na 16<sup>a</sup> semana de vida). Pela presença de resíduos na gaiola, observamos que os animais dividem-se entre a A1 e a A3, em certos momentos, com presença de um maior número de animais na Área 1 (14<sup>a</sup> semana de vida) ou na Área 3 (16<sup>a</sup> semana de vida).

A partir destes resultados, sugerimos um esquema de estrutura hierárquica revelando a alta dinâmica na alternância entre dominantes e subordinados. Na figura 7, a partir do encontro de dois triângulos inversos estipulamos 4 categorias: A – triângulo central (azul claro) – dominante, apenas um único animal que exerce com diferentes intensidades de agressividade a sua liderança no grupo. B - triângulos vermelhos – disputantes: são vários animais que agredem e são agredidos pelo dominante durante a dinâmica de busca pela liderança. C – dentro do triângulo – neutros: são alguns animais que não se envolvem nos episódios agressivos. D – triângulo inferior (azul escuro) chamamos de “subordinado alvo”, pois até 90%

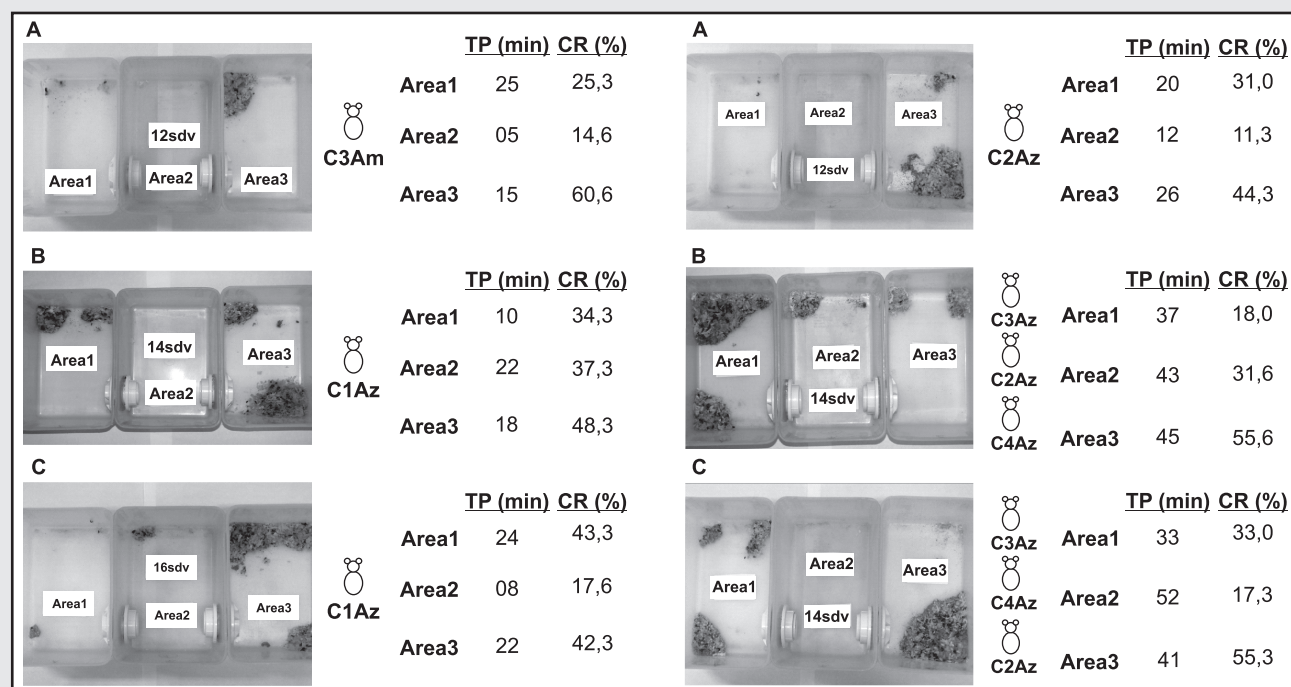
dos ataques são direcionados a este indivíduo. Consideramos pela dinâmica de dominância, que os subordinados estão ligados a todas as categorias. Dependendo do momento em que observamos os indivíduos que estão ligados aos eventos agressivos podem estar promovendo ou sofrendo a agressividade.

## 5 DISCUSSÃO

Acredita-se que, em animais sociais, o estabelecimento da estrutura hierárquica é uma característica evolutiva desenvolvida para a perpetuação e evolução da espécie<sup>18,19</sup>. A organização de grupos, bandos, tribos, clãs e sociedades facilitam no

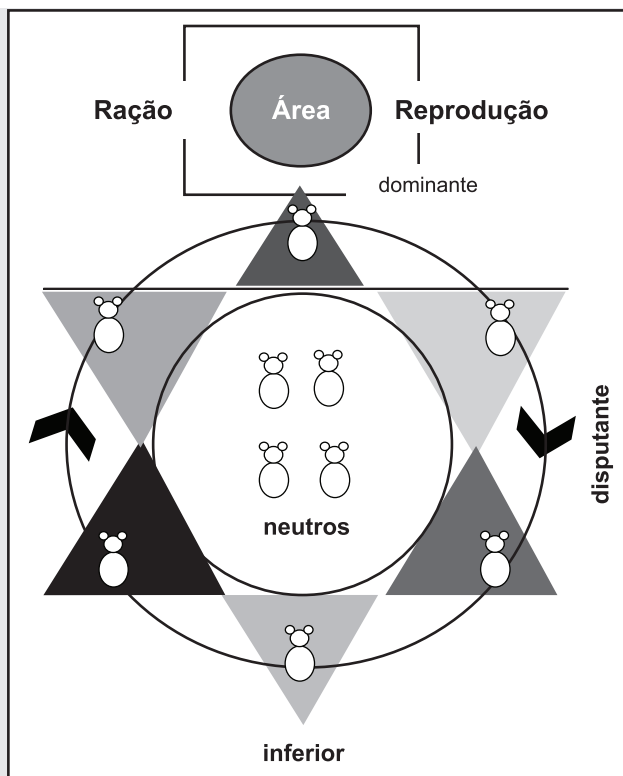
desempenho das respectivas funções dentro dos agrupamentos e possibilitam o maior acesso e aproveitamento dos recursos necessários para os indivíduos<sup>19</sup>. Há diversos estudos, em várias espécies, tanto em cativeiro quanto em vida livre, descrevendo a dinâmica das relações e das posições sociais dentro de um grupo de animais<sup>20,21,22,23</sup>. No entanto, poucos trabalhos relacionam-se ao estudo do camundongo, principalmente em biotérios.

Neste trabalho, observamos que camundongos machos da linhagem Swiss Webster quando agrupados jovens, formam algum tipo de relação “fraternal” e não há a demonstração clara de estrutura hierárquica clássica determinada pela presença de dominantes (agressores) e subordinados (agredidos)<sup>24,25</sup>. Acreditamos que haja algum tipo de liderança estabelecida e talvez alguma organização



**Figura 6 e 7:** Relação entre a presença do dominante e o consumo de ração: Na 12ª (A), 14ª (B) e 16ª (C) semana de vida mensuramos o tempo de permanência (minutos) do dominante nas áreas (A1, A2 e A3) e correlacionamos com o percentual de consumo de ração de cada área para os sistemas S1 (Fig. 6) e S5 (Fig. 7). Fotografamos cada sistema, nas respectivas semanas, após 72 horas da última limpeza de gaiola e evidenciamos maior deposição de dejetos em áreas contrárias a presença do dominante.





**Figura 8:** *Estrutura social de camundongos em biotério:* Após seis semanas de observação, identificamos as categorias: a) dominância: exercida por apenas um único animal, com diferentes intensidades de agressividade (triângulo claro); b) subordinados: dividimos esta categoria em: disputantes (envolvidos nos eventos agressivos – triângulos), neutros (não envolvidos em eventos agressivos – hexágono no interior da figura) e subordinado alvo (que sofre o maior número de agressões do dominante – triângulo escuro). Sugerimos que esta estrutura hierárquica obedece a uma dinâmica variável, principalmente entre o dominante e os subordinados (disputantes e alvo), mantendo-se fixos os neutros. Também acreditamos que o objetivo da dominância é o acesso e permanência exclusiva na área ocupada, para garantir o alimento e aumentar as chances de acasalamento.

social, porém não estabelecida através da agressividade. Este resultado está de acordo com outro estudo da literatura quando revisa a influência do instinto, principalmente nas relações humanas. Este autor descreveu que em insetos e outros animais, a primeira estrutura social estabelecida para animais sociais é a família. Dentro da qual, busca-se proteção e a cooperação entre os indivíduos<sup>19</sup>. Nossos resultados corroboram esta ideia onde os mesmos camundongos agrupados quando jovens, reconhecem-se, possivelmente pelo sistema de feromônios<sup>26,27</sup>, e na confrontação com um grupo diferente e o estabelecimento de uma hierarquia despótica (agressiva) o dominante tende a proteger os seus semelhantes e facilitar seu acesso a alimentação.

O camundongo é um animal com metabolismo altamente acelerado, com maturidade sexual (idade adulta)<sup>1,2</sup>. É coerente observarmos uma rápida dinâmica entre suas relações sociais. Estes animais quando reagrupados em idade adulta busca estabelecer uma hierarquia baseada em um único dominante (com agressividade de intensidade variável) e subordinados (que sofrem as agressões). Porém através do SGI foi possível detalhar um pouco mais esta estrutura. Observamos que há a presença de dominantes e subordinados, porém dentre estes subordinados, há indivíduos que são disputantes a dominância e envolvem-se em eventos agressivos e indivíduos, que chamamos de “neutros”, que se subordinam, não disputam a dominância e buscam não envolver-se nos eventos agressivos. Outra categoria nos chama a atenção que é o “subordinado alvo” que sofre quase 90% das agressões do dominante e demonstra lesões significativas. Tendemos a acreditar que este animal ocupa a posição mais inferior da escala social, por sua presença ser uma ameaça permanente ao dominante.

Acreditamos que o objetivo do dominante está relacionado ao seu instinto primitivo, obedecendo principalmente a seleção sexual<sup>19,28</sup>. Através do SGI, observamos que o dominante busca uma área exclusiva para sua permanência, isolando o restante do grupo para outra área. Comparando outros animais sociais, sugerimos que esta atitude

está relacionada ao acesso a alimentação e também a reprodução, pois estabelecendo seu território sem oponentes facilitaria seu acasalamento, no caso do surgimento de alguma fêmea<sup>19</sup>.

Este territorialismo torna-se evidente quando há o estabelecimento definido do indivíduo dominante e ausência (observável) de disputantes agressivos. É relevante também discutir que durante o processo de disputa e troca de dominantes, há a preferência do indivíduo pela área de passagem (A2), pois possibilita a observação de todos os indivíduos e encontrar mais facilmente o “subordinado alvo”. Além disso, apesar da exclusividade da área para o acesso a alimentação, o estabelecimento da dominância é uma situação estressante para todo o grupo, principalmente para o dominante. Em todos os casos, observamos que o dominante e o disputante (mais ativo) demonstram perda de peso, assim como em fases de maior agressividade dentro do grupo. Por exemplo, quando não há uma aceitação completa do dominante. Quando há esta aceitação, tanto o dominante quanto os demais componentes do grupo apresentam ganho de peso.

Finalizando, a dominância não está relacionada ao “mais forte” e sim ao mais adaptado<sup>19,29</sup>. O peso corporal destes animais, assim como a sua força muscular, não esteve diretamente relacionada a posição de dominância hierárquica e nem aos seus disputantes. Na literatura, principalmente em primatas não humanos, normalmente relaciona-se a disputa de liderança a diferença de idade. Os mais jovens disputam com o dominante, geralmente o

mais velho<sup>30</sup>. No caso de camundongos em biotério, não parece ser este fator primordial.

## 6 CONCLUSÕES

O SGI demonstrou ferramenta útil para a avaliação comportamental de camundongos em biotério. A manutenção tradicional de camundongos em uma gaiola simples e pequena impossibilita a aplicação do comportamento exclusivista e territorialista do dominante. Através do SGI foi possível observar o objetivo do dominante e também outras posições sociais dentro do grupo, como dominantes, subordinado (disputantes e neutros) e “subordinado alvo”. Além disso, também foi possível pelo SGI, observar que camundongos, quando agrupados jovens, reconhecem-se durante a idade adulta e mesmo quando confrontados com outros indivíduos de outros grupos mantêm sua relação de afinidade.

## 7 AGRADECIMENTOS

À Dr<sup>a</sup> Maria de Nazaré Corrêa Soeiro, Chefe do Laboratório de Biologia Celular / IOC pelo apoio logístico para os ensaios e da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e o CNPq pelo apoio financeiro.

## STUDY OF HIERARCHY SWISS WEBSTER MICE THROUGH THE USE OF INTERCONNECTED SYSTEMS CAGES (ISC)

The mice in animal facilities are a social animal, aggressive and extremely territorial. The relationship between the individual and the group as well as their search access to feed, reproduction and promotes structuring a hierarchical order. This hierarchy is classically associated with aggressors (dominant) and who is attacked (subordinate). Through the use of Interconnected Systems Cages (ISC), we find to clarify the dynamics of this structure and the social position (depending on the period observed). Our results show that the lineage Swiss Webster mice are capable of forming affinity relations (fraternal) when grouped young. These animals prefer to remain among their fellows after the regrouping. The dominance is performed by only one individual and suggest that the goal of this attitude is the exclusive access to a particular area and encouraging to food and mating. When divided into two categories, the dominant protects his fellow of opposite category to attacks. Subordinates may vary between those who find dominance (disputants) and individuals who find not to engage in aggressive episodes (neutral). There is an individual who suffers up to 90% of the aggressive actions of the dominant call this category as "subordinate target".

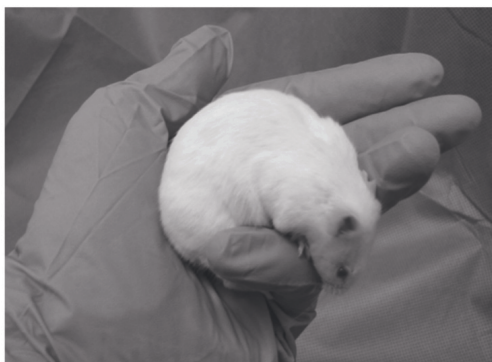
**Keywords:** Mice. Social Behavior. Hierarchy and dominance status.

ABSTRACT

1. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de Laboratório: Criação e Experimentação. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz; 2002. p.60-87.
2. Batista WS, Pereira da Silva LCC, Demarque KC, de Oliveira FS, Acquarone M, Rodrigues FVB, Oliveira GM. Estudo do comportamento agressivo de camundongos em biotério: Aplicação do Modelo Espontâneo de Agressividade (MEA). RESBCAL. 2012; 1(4):46-51.
3. Bissazza A. Social organization and territorial behavior in three strains of mice. *Boll Zoo*. 1981; 48(4): 157-67.
4. Blanchard DC, Blanchard RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*. 1988; 39(6):43-68.
5. Buss DM. Evolution of desire. New York: Basic Books; 1982. p.23-89.
6. Carpenter CR. A field study of the behavior and social relations of howling monkeys. *Comp Psychol Monog*. 1934; 23(10):1-168.
7. Dalmaso AC, Codenotti TL. Comportamentos de hierarquia e dominância em grupos de bugios ruivos, *Alouatta guariba clamitans* (Cabrera, 1940), em cativeiro. *Rev Etol*. 2010; 2(9):45-48.
8. Dennet DC. Darwin's dangerous Idea: Evolution and the meaning of life. Penguin press. New York. 1995. p.456-82.
9. Dulac C, Torello AT. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(9): 551-62.
10. Fox GM, Cohen JB, Franklin ML. Mice. In: *Laboratory Animal Medicine*. New York. Academic Press; 1984. p.1-10.
11. Ginsburg B, Alice WC. Some effects of conditioning on social dominance and subordination in inbred strains of mice. *Phys Zool*. 1942; 15(3):485-506.
12. Hilakivi LA, Lister RG, Durcan MJ, Ota M, Eskey R, Mefford I, Linnoila M. Behavioral, hormonal and neurochemical characteristics of aggressive alpha mice. *Brain Res*. 2009; 502(9): 158-66.
13. Hilakivi LA, Ota M, Lister RG. Effect of isolation on brain monoamines and the behavior of mice

REFERÊNCIAS

- in tests of exploration, locomotion, anxiety and behavioral 'despair'. *Pharmacol Bioch Behav.* 1989; 33(4): 371-4.
14. Ko GM, De Lucca RR. Camundongo. In: Lapchick V, Mattaraia V, Ko G, editores. *Cuidados e Manejos de Animais de Laboratório.* São Paulo. Editora Ateneu; 2009. p.137-67.
15. Lin DY, Zhang SZ, Block E, Katz LC. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature.* 2005; 23(1):123-45.
16. Lloyd JA & Christian JJ. Relationship of activity and aggression to density in two confined population of house mice (*Mus musculus*). *J Mammal.* 1967; 48(8):262-9.
17. Mondragon R, Mayagoitia L, Lopez-Lujan A, Diaz JL. Social structure fetures in three inbred strains of mice C57Bl/6, BALB/cJ and NIH: Comparative study. *Behav and Neur Biol.* 1987 Jul 47(1): 384-91.
18. Nadanovsky P, Celeste R, Wilson M, Daly M. Homicide and impunity: an ecological analysis at state level in Brazil. *Rev Saude Publica.* 2009; 43(5):733-42.
19. Oliveira GM. Hierarquização em agrupamentos. In: *Comportamento de Camundongos em Biotério.* Mattaraia VG, Oliveira GM. São Paulo:Poloprint; 2012. p.179-94.
20. Reimer JD & Petras ML. Breeding structure of the mouse, *Mus musculus*, in a population cage. *J Mammal.* 1967; 48 (8): 88-99.
21. Rodrigues FVB, Klouzel MA, Demarque DM, Rangel JA, Pereira da Silva LCC, Batista WS, et al. Etograma de camundongos em biotério II: Quais são as principais diferenças no comportamento de Swiss Webster e BALB/c? RESBCAL submetido em Ago de 2013.
22. Ruis MAW, Brake JHA, Buwalda B, De Boer SF, Meerlo P, Korte SM, et al. Housing familiar male wildtype rats together reduces the long-term adverse behavioural and physiological effect of social defeat. *Psychoneuroendocrino.* 1999; 24(2): 285-300.
23. Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Ginies C, Semon E, Perrier G. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature.* 2010. 424(10): 68-72.
24. Schjelderup-Ebbe P. Sociable Verhaltinisse bei saugetiieren. *Zeitschr F Psychol.* 1925; 97(6):120-45.
25. Terranova ML, Laviola G. Scoring of social interactions and play in mice during adolescence. In: *Mice*, Wiley G, editor. New Jersey: Hoboken press. 2005. p.23-56.
26. Van Kreveld D. A selective review of dominance-subordination relations in animals. *Gen PsychoL Monograph.* 1970; 38(9):143-73.
27. Varlinskaya EI, Spear LP, Spear NE. Social behavior and social motivation in adolescent rats: role of housing conditions and partner's activity. *Physiol Behav.* 1999; 67(5): 475-82.
28. Winston R. Instituto humano. Grã Bretanha: Editora Globo; 2006. p. 1-52.
29. Wrangham RW, Wilson ML, Muller MN. Comparative rates of violence in chimpanzees and humans. *Primates.* 2006; 47(5):14-26.
30. Yebkes RM, Yebkes AW. Social behavior in infra-human primates. In: *A Handbook of Social Psychology.* Murchison C, editor. Worcester: Clark University Press; 1935. p. 973-1033.



**Associe-se à SBCAL/COBEA e participem do desenvolvimento da ciência dos animais de laboratório através do conhecimento, promoção e uso ético dos animais.**

# DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE UM SOFTWARE LIVRE PARA O GERENCIAMENTO DE UM BIOTÉRIO BRASILEIRO

Giovanny Augusto Camacho Antevero Mazzarotto<sup>1,2</sup>  
Guilherme Ferreira Silveira<sup>1</sup>

1. Laboratório de Virologia Molecular- Fiocruz/ PR, Curitiba, Brasil
2. Biotério, Instituto Carlos Chagas - Fiocruz/ PR, Curitiba, Brasil.

Autor para correspondência:  
Guilherme Ferreira Silveira  
E-mail: gfsilveira@gmail.com

Recebido para publicação: 07 de junho de 2013  
Aceito para publicação: 02 de julho de 2013

Com o advento da promulgação da Lei 11794/2008 (Lei Arouca), posteriormente regulamentada pelo Decreto 6899/2009, iniciou-se uma corrida para a implementação de mudanças no cenário da experimentação animal no Brasil, com ênfase para a necessidade de melhorias no gerenciamento dos biotérios. Com o intuito de facilitar essas melhorias, o uso de softwares específicos para o gerenciamento de biotérios tornou-se uma opção atrativa para a manutenção e recuperação dos dados das diferentes rotinas do criatório animal. Estes programas proporcionam melhor visualização da alocação dos recursos financeiros e facilitam tomadas de decisões gerenciais mais rápidas e seguras. Com o objetivo de melhorar a capacidade do processo gerencial do nosso biotério, desenvolvemos e implementamos um software baseado em linguagens de acesso livre, denominado BioterC. As etapas de desenvolvimento e implementação do software foram fundamentadas na interação direta entre o desenvolvedor e os bioteristas, propiciando a construção de uma ferramenta robusta, versátil, de uso intuitivo, em um conceito de elevada adaptabilidade e flexibilidade, sem qualquer investimento adicional com hardware por parte do biotério. Uma vez colocado em uso, o programa pôde ser posteriormente adaptado, visando à adequação do software com a realidade apresentada na rotina de cada ambiente do biotério. No presente relatório técnico descrevemos o desenvolvimento e a implementação de um software baseado em linguagens de programação de acesso livre, utilizado como uma ferramenta gerencial aplicada a biotérios.

**Palavras-chave:** Biotério. Software livre. BioterC.

RESUMO

## 1 INTRODUÇÃO

### Situação atual do gerenciamento dos biotérios brasileiros

Após a promulgação da Lei 11794/2008 (Lei Arouca), que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, o Brasil ganhou um alicerce sólido na Ciência de Animais de Laboratório (CAL). Antes da referida lei, este ramo da ciência foi dominado por um vácuo

jurídico-regulatório que perdurou por décadas. Com a regulamentação da referida lei através do Decreto 6899/2009, surgiu a necessidade da implementação de mudanças em muitos biotérios do Brasil, com destaque para a necessidade de melhorias no controle gerencial. Este controle gerencial possibilita o aumento da rastreabilidade da produção de animais em termos qualitativos e quantitativos, além de uma visão mais ampla e transparente dos demais processos produtivos que acontecem dentro do biotério. Adicionalmente, o controle gerencial, quando bem executado, pode

ser traduzido no acréscimo da capacidade de sustentabilidade financeira do local<sup>1</sup>.

Os biotérios são classificados de acordo com o projeto arquitetônico e em função da finalidade a que se destinam, considerando ainda as barreiras sanitárias implementadas no local<sup>2</sup>. Em geral, biotérios com desenhos arquitetônicos complexos e com grande número de barreiras sanitárias implementadas têm custos operacionais maiores e demandam, conseqüentemente, maior controle gerencial.

Independente da classificação do biotério, a falta de um processo de gerenciamento eficaz é capaz de reduzir as tomadas de decisões no processo de produção dos animais, além de dificultar a visualização do emprego dos recursos financeiros. Agregado a estes problemas estão a dificuldade para o planejamento de metas e a inviabilidade para o estabelecimento do valor real para cada animal produzido. Como resultado dessa falta de controle de custos, muitos biotérios acabam se tornando setores onerosos para as instituições a que pertencem.

Na tentativa de implementar um controle gerencial vários biotérios brasileiros ainda mantêm a prática usual de utilização de planilhas de Excel (Microsoft Office) para a tabulação dos dados oriundos das diferentes atividades realizadas dentro do criatório. A interface dessas planilhas, salvo raras exceções, não têm formato intuitivo, fato que pode comprometer o processo de adesão da equipe do biotério no que diz respeito ao cadastro mais pontual e acurado dos dados. Além disso, a utilização de planilhas de Excel para fins institucionais depende da obtenção de licenças pagas para o uso do software.

Diante dos desafios observados em nossas rotinas de criação de animais, a alternativa mais viável, considerando inclusive aspectos econômicos, foi desenvolver um software adaptado à realidade das rotinas realizadas em nosso biotério. Diante do exposto, o presente relatório técnico detalha o desenvolvimento e a implementação de um software de gerenciamento de biotérios baseado em linguagens de programação de livre acesso.

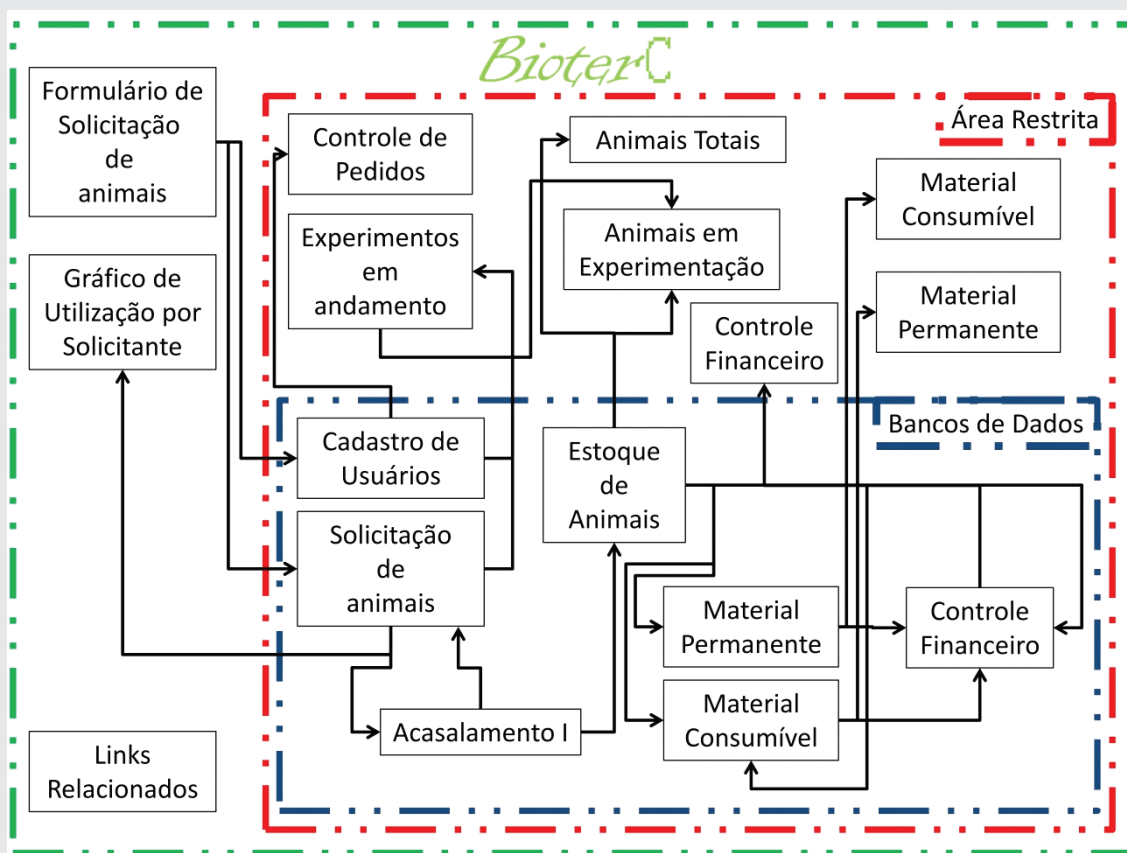
## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### Desenvolvimento computacional do software BioterC

O desenvolvimento do software BioterC foi realizado em sua totalidade por um programador utilizando o conceito de liberdade, uma vez que não se baseou em softwares fechados (como a plataforma Office). Este desenvolvimento foi feito utilizando-se do conceito da Programação Orientada a Objetos, com o uso de lógicas de programação que visam extrair o máximo de informações dos bancos de dados gerados. As linguagens usadas na elaboração do software envolveram a marcação web HTML, com a inserção de *scripts* utilizando-se lógica em PHP e com o estilo gráfico determinado com CSS. Adicionam-se a estes, regulação e controle do navegador com JavaScript e todo o conceito de armazenamento de informações fornecida pelo MySQL, resultando em um software com total integração entre as diferentes áreas virtuais (Figura 1).

O BioterC foi dividido primariamente em duas partes. A primeira destina-se ao usuário de animais e consiste de um formulário que pode ser preenchido *on-line* (Figura 2). Nesse formulário o usuário solicita - com todos os detalhes técnicos necessários ao bioterista - os animais utilizados nos experimentos. A solicitação é confirmada via *e-mail* e segue para a segunda área do programa. Esta área é restrita aos bioteristas e contém as principais ferramentas do software. A área restrita é organizada em três seções: animais, estoque e gráficos.

Na seção animais (Figura 3), encontram-se todas as etapas de manejo da colônia de animais do biotério. Nessa seção o bioterista localiza todas as solicitações realizadas pelos usuários, destinando os animais do estoque do biotério a cada solicitação. Novamente, um *e-mail* automático de confirmação é enviado ao usuário informando que o animal encontra-se disponível para o uso. O estoque de animais, também localizado na seção animais, é formado pelo controle de acasalamentos, nascimentos e sexagens das linhagens, com-



**Figura 1:** Overview do software BioterC. A área delimitada pela linha externa representa todo o conjunto de dados componentes do software. O usuário do biotério acessa o programa, pelo link da *world wide web* (<http://www.bioterio.net/>) onde tem acesso ao formulário de solicitação de animais, o índice gráfico de utilização do biotério e links relacionados com o bioterismo. Intrínseco a esta interface, podemos encontrar a região do software destinada ao controle do biotério, delimitada em cinza médio e reservada aos bioteristas. Nesta região fica toda a parte de movimentação de número de pedidos e andamento dos experimentos, número total de animais e em experimentação, acasalamentos, nascimentos e sexagens. Adicionalmente a estas movimentações, fica o controle de matérias de consumo, como maravalha, ração, anestésicos, etc, e materiais permanentes como caixas, grades, etc. Ligando, organizando e controlando todos estes dados ficam os bancos de dados, em cinza escuro, os quais são administrados pelo programador, e tem como objetivo, além de proporcionar todo o funcionamento do programa, gerar os índices para melhorar a produção, dando origem ao controle financeiro do biotério e visualização através de gráficos e análises estatísticas.

pondo todas as informações de produção. Com este controle, o bioterista pode organizar as caixas do estoque com base na data de nascimento dos animais, obtendo desta forma uma lista ordenada e com identificação única para cada caixa. A partir da lista de caixas estoque, os animais podem

seguir três destinos: experimentação, montagem de acasalamentos ou descarte zootécnico (no caso de animais não saudáveis), fechando assim o ciclo produtivo do plantel.

A segunda seção da área restrita do BioterC, chamada de estoque, destina-se ao controle de todos

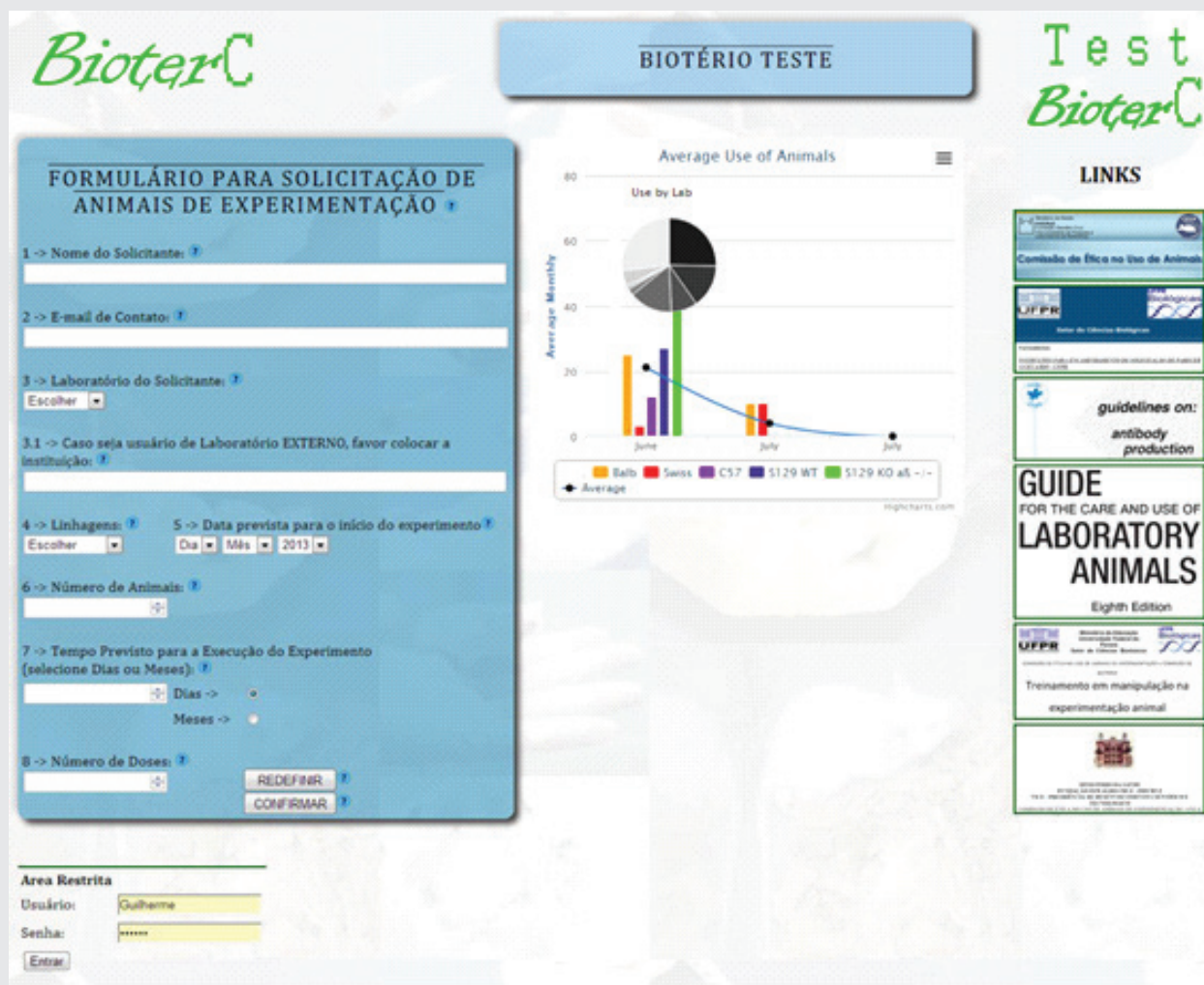


Figura 2: Formulário de solicitação de animais. Área de acesso livre para os usuários do biotério, onde são adicionadas as informações de solicitação ao bioterista.

os insumos, consumíveis, equipamentos e materiais utilizados no biotério. O controle de insumos como ração, maravalha, anestésicos e analgésicos fica na lista itens da lista geral em estoque (Figura 4). Itens como caixas, grades, e outros são organizados na subdivisão material permanente. Na seção estoque, o bioterista pode controlar a solicitação, entrada e saída dos itens de forma independente, com registro por lote e validade, propiciando o rastreamento de todo o material utilizado no biotério em função de determinado período de tempo.

Na terceira e última seção do BioterC, designada de gráficos (Figura 4), são compiladas todas as

informações das seções animais e estoque. Nesta seção, os dados compilados geram gráficos que auxiliam na visualização dos diferentes processos produtivos do biotério. Algumas das informações encontradas são: período médio para nascimentos e sexagens dos animais após acasalamentos, tempo médio de fornecimento dos animais aos usuários, destinação dos animais produzidos, médias de produção de cada linhagem e gastos mensais de itens consumíveis/animais produzidos. Todos estes dados são atualizados automaticamente sendo que o software pode receber a inclusão de novas variáveis de acordo com a necessidade do biotério.



**Biotex**

BIOTÉRIO TESTE

**Test**  
**Biotex**

**Bioterista:**

Animais    Estoque    Material Permanente

Gráficos    Incluir Usuários

### LISTA DE PEDIDOS

M	Solicitante	Laboratório	Linagem	Data de Início	Número de Animais	Dia ou Mês	Tempo	Número de Doses	Data de Solicitação
1	Z_ex	Lab_3	CS7	20-06-2013	12	dia	3	3	02-06-2013
2	E_ex	Lab_4	S129_WT	13-07-2013	20	mes	2	4	02-06-2013
3	Z_ex	Lab_7	S129_WT	06-08-2013	1	dia	1	1	02-06-2013
4	E_ex	Lab_8	S129_WT	03-06-2013	6	dia	2	2	02-06-2013
5	S2_ex	Lab_2	Balb	08-06-2013	4	mes	2	2	02-06-2013
12		Lab_1	Swiss	19-12-2013	3	dia	12	4	10-06-2013
13		Lab_1	Balb	19-12-2013	1	dia	1	1	15-06-2013
14		Lab_2	Balb	04-12-2013	10	dia	10	1111	29-06-2013
15		Lab_1	Swiss	14-07-2013	10	dia	9	21	30-06-2013

**Legenda Solicitações:**

- Novas.
- Com menos de 30 dias para o início do experimento e animais não entregues.
- Com data de início do experimento vencida e animais não entregues.
- Experimentos em andamento.

Entre com o NÚMERO do Id para o fornecimento de um pedido:

Para atualizações realizadas hoje, 17-07-2013, clique na caixa ao lado.

Data do Fornecimento: Da  Mês  Ano

Caso deseje finalizar o pedido, marque ao lado.

Para ver os animais em estoques, clique na linhagem abaixo:

### ANIMAIS EM ESTOQUE

Id	Linagem	Data Nascimento	Nº Machos	Nº Fêmeas	Id Acasalamento
52_45	S129_WT	27-06-2013	2		30
53_45	S129_WT	27-06-2013		1	30
55_45	S129_WT	23-06-2013		1	10
57_45	S129_WT	23-06-2013	1		10

**Descartes Zootécnicos:**

Entre com o NÚMERO do Id para o descarte de um animal:

Para atualizações realizadas hoje, 17-07-2013, clique na caixa ao lado.

Ou selecione a data no campo ao lado: Da  Mês  Ano

Descarte (M)

Descarte (F)

Observações:  Escolher

Outras Observações:

### BALB EM ACASALAMENTO

Id	Linagem	Data Acasalamento	Nº F	Data Nascimento	Nº Nasc	Data Sexagem	Nº Mac	Nº Fem
51_ac	Balb	07-06-13	1,3	20-06-13		19-07-13		
				28-06-13		19-07-13		
				28-06-13		19-07-13		
56_ac	Balb	25-08-13	0,3	15-09-13		06-10-13		
				15-09-13		06-10-13		
				15-09-13		06-10-13		
57_ac	Balb	19-07-13	1,3	09-08-13		30-08-13		
				09-08-13		30-08-13		
				09-08-13		30-08-13		

Atualizar os Acasalamentos, entre com o NÚMERO do Id:

**Modifique as datas apenas caso as mesmas sejam diferentes da tabela:**

Para atualizações realizadas hoje, 17-07-2013, clique na caixa ao lado.

**Troca de macho, mantendo o mesmo número de fêmeas, clique:**

Data da Troca: Da  Mês  Ano

**Troca de fêmea, mantendo o mesmo número de machos, clique:**

Indique o número de fêmeas substituídas:

Data da Troca: Da  Mês  Ano

**Finalização do acasalamento com descarte de animais, clique:**

Data da Finalização: Da  Mês  Ano

**Nascimento:**

Da  Mês  Ano

Número de Nascidos: Nº Nascidos

**Sexagem:**

Da  Mês  Ano

Número de Animais Sexagem: Nº Machos  Nº Fêmeas

### ANIMAIS NO BIOTÉRIO

Linagem	Machos Estoq	Fêmeas Estoq	Machos Exper	Fêmeas Exper
Balb	30	36	1	3
Swiss A	0	0	0	0
Swiss B	0	0	0	0
Swiss C	0	0	0	0
Swiss D	0	0	0	0
Swiss E	7	6	0	0
CS7	1	20	2	4
S129_WT	3	2	5	7
S129_KOab	9	8	0	0
Total	50	80	8	14

Figura 3: Entrada da seção Animais. Destaque para as tabelas de dados de solicitação de animais, acasalamento, estoque e número total de animais.



Figura 4: Estoque de materiais consumíveis no BioterC. Manejo de insumos no biotério, propiciando a rastreabilidade de itens em relação a produção.

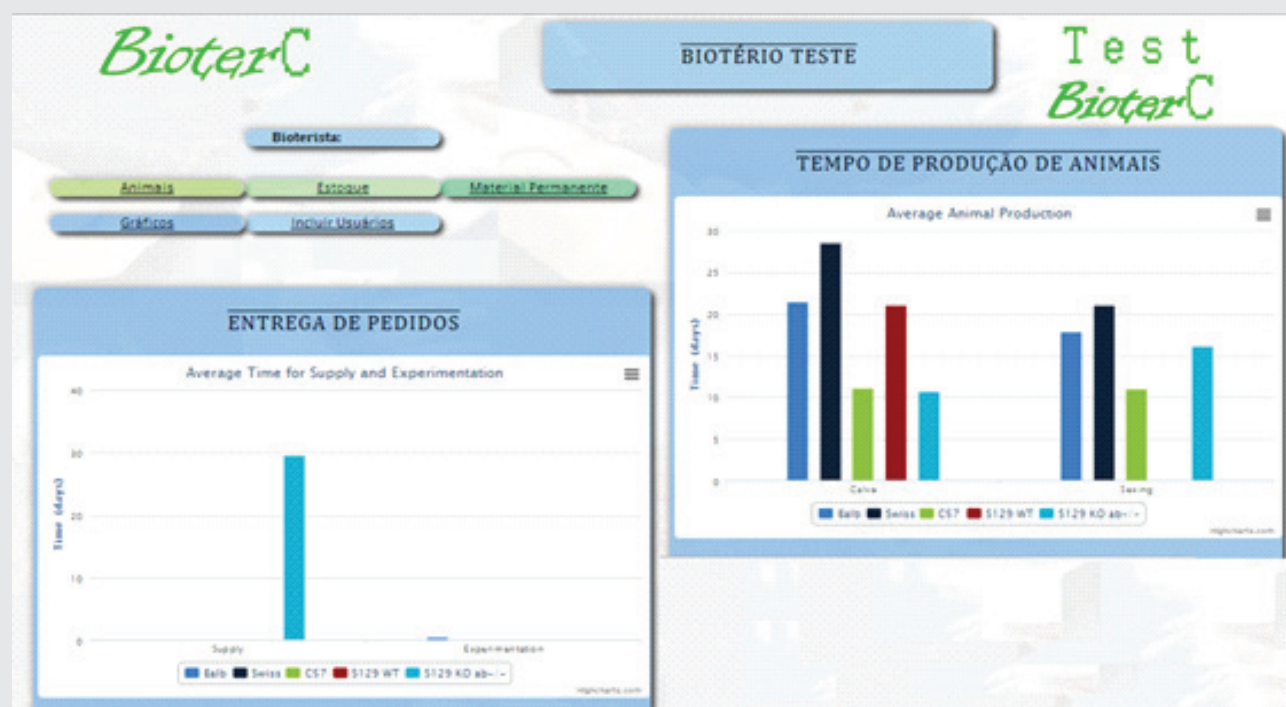


Figura 5: Exemplo de gráficos de Tempo de Produção de Animais e Entrega de Pedidos no BioterC.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A elaboração do software BioterC foi fundamentada na interação direta do desenvolvedor com os bioteristas, propiciando a construção de uma ferramenta flexível e altamente adaptada às diferentes rotinas existentes no biotério. Diferente de outras soluções comerciais utilizadas nos biotérios, uma vez disponibilizado e colocado em uso, o software pôde ser posteriormente adaptado, visando à adequação com a realidade de cada ambiente e atividade do biotério. Em congruência com estes mesmos conceitos, o BioterC foi totalmente disponibilizado *online*, pelo endereço <http://www.bioterio.net>, sem a necessidade de investimento em hardware. Este fato agilizou a coleta dos dados uma vez que o software pode ser acessado de qualquer equipamento com acesso a Internet. O BioterC proporcionou um aumento da capacidade de registro e diminuição do tempo de recuperação dos dados nos processos do biotério.

O software viabilizou a transmissão padronizada das informações sobre os regulamentos internos do biotério e gerou acréscimo na capacidade de previsibilidade no fornecimento e produção dos animais. Observou-se ainda ganhos na capacidade de gerenciamento de estoques de

ração, anestésicos, adjuvantes e demais materiais permanentes.

### 4 CONCLUSÃO

Os benefícios da utilização do BioterC já puderam ser observados nos três primeiros meses de utilização do programa. O uso do BioterC gerou ganhos mensuráveis que puderam ser traduzidos na segurança de aplicação de recursos financeiros e no aumento da confiança da equipe do biotério diante a implementação, execução e gerenciamento das rotinas. Por fim, o estabelecimento e implementação do BioterC aumentou a visibilidade das ações do biotério não só em nível intra-institucional, como também para outros biotérios de Curitiba.

### 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a MSc. Camila Zanluca pela revisão criteriosa do conteúdo deste relatório técnico e à bioterista Tania Rocio Schepainski pelas as contribuições técnicas na formatação do manejo operacional do programa

## DEVELOPMENT AND EMPLOYMENT OF FREE LANGUAGE-BASED SOFTWARE FOR THE MANAGEMENT OF A BRAZILIAN LAB ANIMAL FACILITY

The publication of Federal Brazilian Law 11.794/2008 (also named Law Arouca), regulated by Decree 6899/2009, was the major circumstance that supported changes in laboratory animal science in Brazil, in special those related to management control. The lack of management into lab animal facilities is related main to a limited capacity of both data recording and data recovery. Thus, softwares specifically developed to maintain and analyze lab animal facilities data helping the overall data management. Furthermore, it allows a better overview of financial resources allocation and can

ABSTRACT

ABSTRACT

be used to take fast management decisions by lab animal staff. In order to improve the management in our lab animal facility was developed and implemented a free language-based software, termed BioterC. The whole software programming was based on close interaction between programmer developer and lab animal staff. This methodology allowed the construction of a robust, versatile, use intuitive, on a concept of high adaptability and flexibility software, without any additional investment in hardware by the lab animal facility. When software began to be used it could be constantly adapted to reality found into each routine from the lab animal facility. In this technical report we describe the developing and implementing of a free language software-based used as management tool applied in lab animal facilities.

**Keywords:** Lab animal facility. Free software. BioterC.

REFERÊNCIAS

1. Júnior-Da Cruz CA. Modelo de gestão em biotério convencional de produção de *Rattus norvegicus* de instituição de ensino superior privada brasileira. *Universitas Ciências da Saúde*. 2003; 1(2):343-62.
2. Carissimi AS, Merusse JLB. Inter-relação do Desenho Arquitetônico. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, KO GM, editores. *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*. São Paulo: Atheneu; 2009; p.73-85.



bvs biblioteca virtual em saúde

**Biblioteca Virtual em Medicina Veterinária e Zootecnia**

FMVZ-USP  
CRMV-SP  
BIREME

<http://www.bvs-vet.org.br>

Uma ferramenta para auxiliar o profissional

**Base Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia - Vet Index**

Indexa artigos publicados em periódicos científicos nacionais

**Base Nacional de Teses (em desenvolvimento)**

Catálogo de dissertações e teses defendidas em todas as instituições de ensino brasileiras

**LIS - Localizador de Informação em Medicina Veterinária e Zootecnia**

Catálogo de fontes de informação em saúde disponível na internet

**Agenda de Eventos e Cursos**

Catálogo nacional on-line contendo os eventos e cursos nacionais e internacionais em Medicina Veterinária e Zootecnia

**Revistas Eletrônicas**

Revistas científicas eletrônicas de acesso gratuito (open access) das áreas de Medicina Veterinária e Zootecnia

**Busca Integrada**

Busca simultaneamente artigos indexados em diversas bases de dados referenciais e com texto completo

Atendimento  
>> ON-LINE

**Das 8h às 17h**  
**De 2ª a 6ª feira**

-  [facebook.com/bvsvet](https://facebook.com/bvsvet)
-  [twitter.com/bvsvet](https://twitter.com/bvsvet)
-  [bvsvet.blogspot.com](https://bvsvet.blogspot.com)
-  [br.linkedin.com/in/bvsvet](https://br.linkedin.com/in/bvsvet)



[www.bvs-vet.org.br](http://www.bvs-vet.org.br)

Biblioteca Virtual em Medicina Veterinária e Zootecnia - Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87  
CEP 05508-270 - São Paulo (SP) - Brasil  
Tel: +55 11 3091-7921 - e-mail: [bvsvet@usp.br](mailto:bvsvet@usp.br)

Parceria de:



# MODELOS ANIMAIS DAS PRINCIPAIS CRANIOSTENOSES HUMANAS

Wladimir Bocca Vieira de Rezende Pinto<sup>1</sup>; Paulo Victor Sgobbi de Souza<sup>2</sup>

1. Médico do Programa de Residência Médica em Neurologia Clínica – UNIFESP
2. Graduando em Medicina – UNIFESP

Autor para correspondência:

Wladimir Bocca Vieira de Rezende Pinto  
E-mail: wladimirbvrpinto@gmail.com

Recebido para publicação: 16 de junho de 2013

Aceito para publicação: 05 de julho de 2013

As craniostenoses representam importante grupo de alterações dismórficas fenotípicas dentro da prática clínica, resultantes do fechamento prematuro das suturas cranianas, originando alterações na orientação do crescimento e desenvolvimento normal do crânio, conforme o comprometimento de uma ou mais suturas. Mais do que comprometimento isoladamente estético, alterações neurofuncionais e cognitivas são comuns, especialmente nos casos das craniostenoses sindrômicas malformativas. Apesar dos fenótipos clínicos serem bastante conhecidos da prática médica, especialmente neurológica e pediátrica, atualmente o conhecimento referente aos mecanismos fisiopatogênicos envolvidos ainda é bastante incipiente. Assim, o conhecimento dos principais modelos experimentais animais e o desenvolvimento de novos modelos dirigidos são fundamentais para a compreensão mais ampla das principais doenças que cursam com tal fenótipo. O objetivo deste artigo é fazer uma breve revisão a respeito dos principais modelos animais descritos para as craniostenoses.

**Palavras-chave:** Modelos animais. Craniostenose. Craniossinostose.

RESUMO

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento ontogenético do crânio humano é muito dinâmico. À época do nascimento, são encontradas 30 suturas cranianas e 10 fontículos, os quais passam por diferentes processos de modificações até a formação do crânio do adulto. O processo de fechamento definitivo da ampla maioria das suturas crânio-faciais se dá predominantemente no adulto jovem, em diferentes idades, conforme o grupamento envolvido. Entretanto, o processo de fechamento dos fontículos se dá precocemente nos primeiros anos de vida, predominantemente no primeiro ano de vida. Assim, os transtornos genéticos hereditários ou os processos adquiridos durante o desenvolvimento que comprometam tanto o desenvolvimento normal ósseo do crânio quanto a formação e o fechamento inapropriado das suturas originam diferentes graus de acometimento dismórfico e neurológico,

integrando desde os chamados desvios fenotípicos menores ou as variantes da normalidade até quadros amplamente malformativos<sup>1</sup>.

As craniostenoses representam importante grupo de alterações dismórficas fenotípicas dentro da prática clínica, pois resultam do fechamento prematuro das suturas cranianas, originando alterações na orientação do crescimento e desenvolvimento normal do crânio, conforme o comprometimento de uma ou mais suturas. Ao fenômeno fisiopatológico de obliteração prematura de uma ou mais suturas dá-se o nome de craniossinostose. Mais do que comprometimento isoladamente estético, alterações neurofuncionais e cognitivas são comuns, especialmente nos casos das craniostenoses sindrômicas malformativas. A maioria dos quadros clínicos de craniostenoses ocorre por fechamento precoce das suturas sagital e coronal, apesar de o acometimento das demais também serem descritos<sup>1</sup>.

Os métodos de classificação das craniossinostoses incluem características referentes ao

mecanismo relacionado ao número de suturas envolvidas primariamente, à condição clínica de base e ao processo etiopatogênico. A classificação é bastante diversa e heterogênea entre os diferentes autores, sendo que as mais importantes se referem ao número de suturas e suas subclassificações e à etiopatogenia<sup>1,2</sup>.

Quanto ao número de suturas envolvidas, pode-se falar em craniostenose simples, no caso de envolvimento de uma única sutura, ou composta, no caso de envolvimento de pelo menos duas suturas. As simples são denominadas conforme o formato do crânio que originam pelo fechamento da sutura, originando assim como seus principais tipos: (i) escafocefalia ou dolicocefalia, por fechamento prematuro da sutura sagital, causando formato de cabeça longa e estreita em vista superior do crânio; (ii) braquicefalia, por fechamento prematuro da sutura coronal bilateralmente, causando formato encurtado do crânio no eixo occipito-frontal; (iii) plagiocefalia ou *flat head syndrome*, por fechamento prematuro unilateral da sutura coronal (na forma anterior) ou da sutura lambdoide (na forma posterior), causando formato assimétrico no eixo diagonal da cabeça; e (iv) trigonocefalia, por fechamento prematura das suturas metópicas, causando frente com formato triangular em V. As compostas subdividem-se: em oxicefalia ou acrocefalia, no caso de fechamento simultâneo de duas ou mais suturas (destacadamente coronal e sagital); e em “crânio em trevo” (*kleiblattschädel* ou *clover leaf deformity*), no caso de fechamento simultâneo de múltiplas suturas<sup>1</sup>.

Quanto ao mecanismo etiopatogênico, dividem-se em craniostenoses deformacionais, àquelas decorrentes de alterações no ambiente materno intra-uterino, e malformativas, àquelas decorrentes de alterações em mecanismos de desenvolvimento intrínseco por alterações cromossômicas, gênicas e/ou ambientais. As mais importantes na prática médica são as craniostenoses malformativas cromossômicas e gênicas, correspondendo à ampla maioria dos casos em que o diagnóstico correto e o aconselhamento genético apropriado devem ser realizados.

Apesar dos fenótipos clínicos serem bastante conhecidos da prática médica, especialmente neurológica e pediátrica, atualmente o conhecimento referente aos mecanismos fisiopatogênicos envolvidos ainda é bastante incipiente. Assim, o conhecimento dos principais modelos experimentais animais e dos principais métodos de estudo do crânio dismórfico do camundongo é fundamental para a compreensão mais ampla das principais doenças que cursam com tal fenótipo.

## 2 MORFOLOGIA BÁSICA DO CRÂNIO DO CAMUNDONGO E SEUS MÉTODOS DE ESTUDO

Tanto a formação quanto a estrutura geral e organização do crânio do camundongo seguem os mesmos mecanismos de desenvolvimento encontrados na formação do crânio humano<sup>3</sup>. O esqueleto ósseo do crânio do camundongo é formado predominantemente por processo de ossificação intramembranosa de tecidos derivados da crista neural ou do mesoderma, através de condensação de células do mesênquima, da formação e expansão de centros e ossificação<sup>4</sup>. Conforme ocorre a expansão e desenvolvimento ósseos, as margens ósseas se aproximam e formam suturas entre si, representadas por mesênquima ladeado por porções osteogênicas. O mesênquima da porção posterior da sutura frontal e da sutura sagital tem sua origem de células da crista neural, enquanto o mesênquima da sutura coronal é de origem mesodérmica e o da sutura lambdoide tem sua origem ainda pouco estabelecida<sup>5,6</sup>.

A avaliação morfológica adequada do crânio do camundongo envolve diversas etapas, seguindo o protocolo *Craniofacial Resource (The Jackson Laboratory)*: (i) avaliação morfológica direta *in-vivo* e *post-mortem* (em autópsia) pela análise da integridade das suturas e das proeminências ósseas do crânio, da distância interorbital, do diâmetro biparietal, do comprimento da mandíbula superior e inferior e do nariz, e da altura do crânio, além de avaliação de anormalidades dentárias; (ii) estudo microscópico ósseo, muscular e das suturas (com

complementação histoquímica); (iii) estudo radiográfico (mais comumente por microtomografia computadorizada com reconstrução tridimensional e eventualmente complementada com densitometria óssea); e (iv) estudo genético-molecular (mapeamento genético por microssatélites, *array-CGH*, *micro-array*, e sequenciamento gênico)<sup>7</sup>.

### 3 MODELOS ANIMAIS PARA CRANIOSTENOSSES HUMANAS MALFORMATIVAS GÊNICAS

As craniostenoses humanas sindrômicas malformativas gênicas representam os tipos mais conhecidos e prevalentes na prática clínica, sendo algumas de tais síndromes bastante reconhecidas por seus achados dismórficos e sistêmicos bastante típicos, conforme resumidos seus principais aspectos na Tabela 1<sup>8,9</sup>. Serão abordadas aqui individualmente as síndrome de Crouzon, de Apert, de Saethre-Chotzen e de Pfeiffer, a cefalopolissindactilia de Greig e a displasia crânio-fronto-nasal. Apesar de remeterem em grande parte os processos fisiopatológicos e achados craniofaciais e esqueléticos encontrados em tais síndromes, a grande maioria dos modelos caracteriza-se por fenótipos de maior gravidade que os quadros clínicos vistos em pacientes.

#### Síndrome de Crouzon (Disostose crânio-facial tipo 1)

O principal modelo descrito para a Síndrome de Crouzon é o *knock-in*  $Fgfr2^{tm1Schl}/Fgfr2^+$  (*fibroblast growth factor receptor 2; targeted mutation 1*, Joseph Schlessinger), também denominado  $Fgfr2c^{C342Y}$ , produzido por inserção intragênica no gene *Fgfr2* no cromossomo 7, na posição 73.19 cM, por vetor direcionado para substituir a cisteína da posição 342 com tirosina no éxon 9, a partir de células-tronco embrionárias W9.5/W95 em linhagem de origem 129S1/Sv-Oca2<sup>+</sup> Tyr<sup>+</sup> Kitl<sup>+</sup>. Caracteriza-se fenotipicamente pelas manifestações de craniossinostose da sutura coronal, fenda palatina, óbito neonatal de alta incidência, fusão

articular inapropriada, proptose ocular e anomalias das cartilagens da traquéia. Em avaliações complementares por dissecação direta e estudo microscópico e por neuroimagem microscópica com microtomografia com reconstrução tridimensional, a obliteração bilateral das suturas coronais ocorre em 80% dos casos e sinostose completa da sutura sagital em 70% e da sutura lambdoide em menos de 40%, além de fechamento da sincondrose pré-esfenóide-basiesfenóide em todos os mutantes<sup>7</sup>.

#### Síndrome de Saethre-Chotzen (acrocefalosindactilia tipo III)

O principal modelo descrito para a síndrome de Saethre-Chotzen é o nocaute  $Twist1^{tm1Bhr}/Twist1^+$  (*twist basic helix-loop-helix transcription factor 1; targeted mutation*, Richard R Behringer), também denominado  $twist1^-$  e  $twist1^{del}$ , produzido por inserção direta intragênica de sequência de neomicina no éxon 1 de células-tronco embrionárias AB1 no gene *Twist1* no cromossomo 12, na posição 14.81 cM, causando deleção intragênica e ocorrendo cruzamento posterior com linhagem 129S7/SvEvBrd-Hprt<sup>+</sup>. Originaram-se fenotipicamente craniossinostose variável, polidactilia, caquexia, defeitos de fechamento do tubo neural, osso escamoso curto, anomalias do osso frontal e da diferenciação osteoblástica, hipoplasia da clavícula e altas incidências de óbito neonatal precoce e embrionário<sup>10</sup>. Acredita-se que a inibição de *Twist1* (*twist basic helix-loop-helix transcription factor 1*, localizado no cromossomo 12 do camundongo) em camundongos por antagonização da via de sinalização do Wnt na sutura sagital origina ossificação endocondral do mesênquima com craniossinostose da sutura sagital<sup>5,11</sup>.

#### Síndrome de Apert (acrocefalosindactilia tipo I)

Para estudo da síndrome de Apert, o modelo de destaque descrito é o *knockin*  $Fgfr2^{tm1Ewj}/Fgfr2^+$  (*fibroblast growth factor receptor 2; targeted mutation 1*, Ethylin Wang Jabs), também denominado  $Fgfr2^{NeoS252W}$  e  $Fgfr2^{S252Wfllox}$ , produzido em linhagem 129X1/Sv por vetor direcionado ao

Tabela 1. Principais causas de craniostenoses malformativas monogênicas<sup>8,9</sup>.

<p><b>Síndrome de Crouzon</b> (genes <i>FGFR2/10q26.13</i>; <i>FGFR3/4p</i> – variante com acantose <i>nigricans</i>) (MIM #123500)</p>	<p>Autossômica dominante. Idade paterna avançada. Braquicefalia, proptose ocular, fronte proeminente, hipertelorismo, hipoplasia do terço médio da face, nariz em formato de “bico de papagaio”, prognatismo relativo, perda auditiva condutiva, atrofia óptica, malformações do sistema nervoso central; acantose <i>nigricans</i>, hidrocefalia e atresia de coanas na variante Ala391Glu.</p>
<p><b>Síndrome de Apert</b> (gene <i>FGFR2/10q26.13</i>) (MIM #101200)</p>	<p>Autossômica dominante (maioria esporádica). Idade paterna avançada. Craniostenose coronal irregular, com diâmetro ântero-posterior curto, acrobraqicefalia, turribraquicefalia, occipício achatado, hipertelorismo ocular, alterações dentárias, alterações do sistema ventricular liquórico, agenesia do corpo caloso e outras malformações estruturais do sistema nervoso, sindactilia completa, acne tardia moderada, fusão vertebral de C5-C6.</p>
<p><b>Síndrome de Pfeiffer (Noack)</b> (genes <i>FGFR1/8p11.23-p11.22</i>; <i>FGFR2/10q26.13</i>) (MIM #101600)</p>	<p>Autossômica dominante. Tipo 1 (clássico): craniossinostose coronal com braquicefalia, hipertelorismo ocular, ponte nasal hipoplásica, maxila estreita, dedos largos com desvio ulnar, sindactilia parcial. Tipo 2: crânio em <i>cloverleaf</i>. Tipo 3: semelhante tipo 2, sem <i>cloverleaf</i>.</p>
<p><b>Síndrome de Saethre-Chotzen</b> (genes <i>TWIST1/7p21.1</i>; <i>FGF2/10q26.13</i>) (MIM #101400)</p>	<p>Autossômica dominante. Craniostenose por coronal, metópica ou lambdoide, acrocefalia, braquicefalia, hipoplasia maxilar, sindactilia parcial, braquidactilia, hálux alargado, hélice da orelha proeminente, clavícula curta com hipoplasia distal. Variante com ptose, blefarofimose e epicanto inverso.</p>
<p><b>Síndrome de Muenke</b> (gene <i>FGFR3/4p16.3</i>) (MIM #602849)</p>	<p>Autossômica dominante. Fenótipo feminino mais grave. Craniostenose frontal, plagiocefalia, macrocefalia, hipoplasia maxilar leve, hipertelorismo ocular, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, epífises em formato de cone, clinodactilia, falange média em dedal, ptose palpebral, perda auditiva neurossensorial variável.</p>
<p><b>Displasia craniofrontonasal</b> (gene <i>EFNB1/Xq13.1</i>) (MIM #304110)</p>	<p>Herança dominante ligada ao X. Fenótipo feminino mais grave. Craniossinostose tipo braquicefalia, fronte proeminente, hipertelorismo ocular, raiz nasal alargada, ponta nasal bífida, assimetria facial, clinodactilia, sindactilia, unhas com cisão longitudinal.</p>
<p><b>Cefalopolissindactilia de Greig</b> (gene <i>GLI3/7p14.1</i>) (MIM #175700)</p>	<p>Autossômica dominante. Polidactilia pré-axial e pós-axial, sindactilia do 1º-3º dedos, hálux alargado, fronte proeminente, hipertelorismo aparente, macrocefalia, craniossinostose (eventual fechamento tardio), escafocefalia, trigonocefalia, raiz nasal alargada.</p>



gene *Fgfr2* no cromossomo 7, na posição 73.19 cM, causando substituição na posição 755-756 de CA por GG inserido, no éxon 3, resultando em troca de serina na posição 252 por triptofano. Posteriormente houve inserção de sequência de neomicina no íntron IIIa no éxon 7, reduzindo expressão do alelo em células-tronco embrionárias R1. Apresenta-se morfologicamente com o seguinte fenótipo: craniossinostoses coronal, lambdoide, metópica e sagital; microcrania com encéfalo aumentado, anomalias do osso parietal, da base do crânio e do arco zigomático, mandíbula curta, palato curto, fenda palatina, osso nasal curto, hidrocefalia comunicante, hipotelorismo ocular e baixo ganho ponderal com alta taxa de óbito neonatal, além eventualmente de proteinose alveolar, bronquiectasia e de alterações da cartilagem traqueal<sup>12</sup>. Tal modelo foi fundamental para mostrar que o evento crítico na ocorrência das craniossinostoses é a perda precoce do mesênquima basal das suturas por alteração na expressão de *Fgfr2* ativado, unindo os centros osteogênicos para formar membrana formadora do esqueleto contígua contínua.

### Displasia ou disostose crânio-fronto-nasal

O principal modelo descrito para a displasia crânio-fronto-nasal é o nocaute *Efnb1<sup>tm1.1Sor</sup>/Efnb1<sup>+</sup>* (*ephrin B1; targeted mutation 1.1, Philippe Soriano*), também denominado *ephrin-B1<sup>null</sup>*, produzido por deleção intragênica no gene *Efnb1* no cromossomo X, na posição 43.22 cM, por recombinação mediada por proteína Cre em células-tronco embrionárias de AK7, removendo éxons 2-5, e pós-acasalamento de animais com *background* genético 129S4/SvJaeSor. Caracteriza-se pela presença de migração anormal de células da crista neural, fenda palatina secundária, falha na fusão palpebral bilateral, morfologia anormal do osso frontal e da sutura coronal, glândulas salivares pequenos, membrana timpânica dismórfica, morfologia anormal das vibrissas, polidactilia e malformação de costelas e das cartilagens da traquéia. Foram observadas também malformações do sistema nervoso manifestas fundamentalmente

por agenesia do corpo caloso e disrupção dos núcleos da base<sup>13</sup>. A importância de tal modelo se deu fundamentalmente para a compreensão do processo dos defeitos embrionários dependentes da migração de células da crista neural relacionados à expressão da efrina-B1.

### Síndrome de cefalopolissindactilia de Greig

O principal modelo descrito para a síndrome de cefalopolissindactilia de Greig é o mutante espontâneo *Gli3<sup>Xt-J</sup>/Gli3<sup>Xt-J</sup>* (*GLI-Kruppel Family member GLI3; extra toes Jackson*), também denominado *extra-toes<sup>J</sup>*, originado por mutação espontânea com deleção intragênica de 51,5 kb no gene *Gli3* no cromossomo 13, na posição 5,43 cM, com *background* genético da linhagem C3H/HeJ. Caracteriza-se fundamentalmente pelas seguintes manifestações fenotípicas: morfologia anormal das suturas lambdoide e sagital, hipoplasia da mandíbula, fenda palatina, anormalidades dentárias, hipertelorismo ocular, macrossomia embrionária, hipertelorismo mamário, perda progressiva de fâneros, polidactilias pré- e pós-axial, polissindactilia, esterno bífido, anomalias pulmonares e hipopigmentação além de achados menos frequentes como membros curtos por encurtamento ósseo com aumento do diâmetro de ossos longos, de anomalias do prosencéfalo e de óbito pré-natal na organogênese<sup>14</sup>. Uma das conclusões que tal modelo permitiu foi o papel decisivo do fator de transcrição *Gli3*, dependente de ligante *hedgehog*, na indução do gene *Twist1*, no desenvolvimento osteoblástico e no controle da proliferação e da diferenciação de osteoprogenitores, principalmente na sutura lambdoide.

### Síndrome de Pfeiffer (de Noack ouacrocefalosindactilia tipo V)

Um dos principais modelos animais em camundongos desenvolvido para estudo da Síndrome de Pfeiffer é o nocaute *Fgfr2<sup>tm2,3Dsn</sup>/Fgfr2<sup>+</sup>* (*fibroblast growth factor receptor 2; targeted mutation 2.3, Clive Dickson*), também denominado *Fgfr2<sup>delta</sup>* e *Fgfr2-IIIc<sup>delta</sup>*, produzido por deleção intragênica

no gene *Fgfr2* no cromossomo 7, na posição 73,19 cM, a partir de deleções no éxon 9 e nas sequências da neomicina e da timidina-quinase através do acasalamento de carreadores do alelo *Fgfr2<sup>tm2Dsn</sup>* com camundongos 129Sv expressando Cre recombinase na linhagem germinativa. O fenótipo morfológico crânio-facial caracteriza-se por maxila curta, crânio em formato de “cúpula” (*dome-shaped*), maxila curta hipoplásica associada com fusão prematura e ossificação da sutura coronal, morfologia arredondada do neurocrânio com extensão dorso-ventral, fusão articular prematura do arco zigomático, proptose ocular e discreta diminuição de comprimento na maioria dos mutantes, além de atraso no ganho ponderal pós-natal com óbito pós-natal precoce até 9 dias. Outros achados menos frequentes foram intolerância à glicose e hipoglicemia por distúrbios intrínsecos dos mecanismos de absorção gastro-intestinal, defeitos leves na lobulação hepática normal, redução no número normal de glomérulos renais com menor volume renal e dilatação dos túbulos contorcidos proximais e distais, lobulação pulmonar parcial com alteração no padrão de alveolização normal e nos bronquíolos terminais, manúbrio do esterno e processo xifóide bifurcados com ossificação anormal, e ausência de glândulas lacrimais<sup>15</sup>.

Uma das principais contribuições do modelo até o momento foi a compreensão da importância da interação da via de sinalização do Wnt com os mecanismos relacionados ao FGF no processo de ossificação endocondral do mesênquima da sutura, semelhante ao que ocorre nas síndromes de Muenke, de Crouzon e de Apert.

#### 4 CONCLUSÕES

As craniostenoses humanas representam em conjunto um dos grupos de transtornos dismórficos do desenvolvimento mais comuns na prática médica. A ampla maioria dos quadros dá origem a acometimento estético sem comprometimento funcional, embora um amplo número de condições clínicas malformativas sindrômicas cromossômicas e gênicas seja conhecido. O desenvolvimento e o conhecimento de modelos animais para o estudo de tais condições clínicas são fundamentais e proporcionarão a oportunidade de compreensão da evolução natural da maioria dos quadros e seu diagnóstico mais precoce, favorecerão o aconselhamento genético de forma mais adequada e ofertarão novas oportunidades terapêuticas.

## ANIMAL MODELS OF THE MAIN HUMAN CRANIOSTENOSIS

### ABSTRACT

Craniostenosis represents an important group of dysmorphic phenotypic changes in clinical practice, resulting from the premature closure of the cranial sutures, causing changes in the orientation of normal growth and development of the skull, according to the compromise of one or more sutures. More than aesthetic compromise alone, neurofunctional and cognitive changes are common, especially in cases of malformative syndromic craniostenosis. Despite the clinical phenotypes are well known in medical practice, mainly neurological and pediatric, the current knowledge regarding the mechanisms involved in its physiopathogenesis are still incipient. Thus, knowledge of the main experimental animal models and developing new targeted models are critical to a broader understanding of major diseases with this phenotype. The objective of this review is to briefly review the main animal models described for craniostenosis.

**Keywords:** Animal models. Craniostenosis. Craniosynostosis.

1. Alonso LG. Aspectos dismorfológicos e moleculares nas craniosinostoses. In: Kim CA, Albano LMJ, Bertola DR. *Genética na prática pediátrica*. 1ª edição. Barueri: Manole, 2010. p.174-87.
2. Merks JHM, van Karnebeek CDM, Caron HN, Hennekam RCM. Phenotypic abnormalities: terminology and classification. *Am J Med Genet*. 2003; 123A:211-30.
3. Thyagarajan T, Totey S, Danton MJ, Kulkarni AB. Genetically altered mouse models: the good, the bad, and the ugly. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14(3):154-74.
4. Opperman LA. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev Dyn*. 2000; 219(4):472-85.
5. Behr B, Longaker MT, Quarto N. Craniosynostosis of coronal suture in *twist1* mice occurs through endochondral ossification recapitulating the physiological closure of posterior frontal suture. *Front Physiol*. 2011;2:37.
6. Morriss-Kay GM, Wilkie AO. Growth of the normal skull vault and its alteration in craniosynostosis: insights from human genetics and experimental studies. *J Anat*. 2005; 207(5):637-53.
7. Perlyn CA, DeLeon VB, Babbs C, Govier D, Burell L, Darvann T, et al. The craniofacial phenotype of the Crouzon mouse: analysis of a model for syndromic craniosynostosis using three-dimensional MicroCT. *Cleft Palate Craniofac J* 2006; 43(6): 740-8.
8. Jones KL. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation*. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.
9. Khanna PC, Thapa MM, Iyer RS, Prasad SS. Pictorial essay: the many faces of craniosynostosis. *Indian J Radiol Imaging*. 2011; 21(1):49-56.
10. Carver EA, Oram KF, Gridley T. Craniosynostosis in *Twist* heterozygous mice: a model for Saethre-Chotzen syndrome. *Anat Rec*. 2002; 268(2):90-2.
11. Behr B, Longaker MT, Quarto N. Differential activation of canonical Wnt signaling determines cranial sutures fate: a novel mechanism for sagittal suture craniosynostosis. *Dev Biol*. 2010; 344(2):922-40.
12. Holmes G, Rothschild G, Roy UB, Deng CX, Mansukhani A, Basilico C. Early onset of craniosynostosis in an Apert mouse reveals critical features of this pathology. *Dev Biol*. 2009; 328(2):273-84.
13. Davy A, Aubin J, Soriano P. Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes Dev*. 2004; 18(5):572-83.
14. Rice DP, Connor EC, Veltmaat JM, et al. *Gli3Xt-J/Xt-J* mice exhibit lambdoid suture craniosynostosis which results from altered osteoprogenitor proliferation and differentiation. *Hum Mol Genet*. 2010; 19(17):3457-67.
15. Hajihosseini MK, Wilson S, De Moerloose L, Dickson C. A splicing switch and gain-of-function mutation in *FgfR2-IIIc* hemizygotes causes Apert/Pfeiffer-syndrome-like phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(7):3855-60.

# INSTRUÇÕES AOS AUTORES

## NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Os artigos devem ser redigidos na ortografia oficial, em uma só face, utilizando o programa Word, em espaço duplo, em folhas formato A4 (21 cm x 29,7 cm), com fonte tamanho 12, com margens de 3 cm em cada um dos lados e numeradas em algarismos arábicos no canto inferior direito da folha.

### Indicativos para Submissão

O conteúdo do material enviado para publicação na RESBCAL não pode ter sido publicado anteriormente em outros veículos. Os custos de publicação envolvem revisão em português e tradução para o inglês. Os artigos e correspondência deverão ser enviados inicialmente por meio eletrônico para o seguinte endereço: [resbcal2011@gmail.com](mailto:resbcal2011@gmail.com). No item assunto deverá ser colocado: **Artigo RESBCAL**. Ele deverá ser anexado em um único arquivo.

### Carta de apresentação

É importante que o trabalho venha acompanhado de uma carta, indicando os pontos relevantes para ajudar no encaminhamento da avaliação preliminar de revisão pelos pares.

### Carta de autorização

Deve conter a assinatura de todos os autores, responsabilizando-se pelo conteúdo do trabalho.

### Carta dos autores

Indicar se existem eventuais conflitos de interesse (profissionais, financeiros e benefícios diretos ou indiretos) que podem ter influenciado os resultados da pesquisa ou o conteúdo do trabalho.

### Considerações éticas

Todos os trabalhos submetidos para publicação deverão estar acompanhados do Certificado de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa da instituição à qual estão vinculados os autores.

Os procedimentos experimentais aplicados deverão apresentar conformidade com os princípios previstos na Lei 11.794 e pelo Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal (CONCEA) para trabalhos produzidos no Brasil; previstos na Convenção Europeia para a Proteção dos Animais Vertebrados Utiliza-

dos para Fins Experimentais e Outros Fins Científicos e seus anexos, para artigos de origem internacional.

Se o desenho experimental ou a metodologia do trabalho apresentado levantar preocupação com a ética ou o bem-estar, o Conselho Editorial fará uma análise para interpretação segundo publicações recentes com as diretrizes nacionais e internacionais adotadas.

Os artigos podem ser: originais, revisão e ponto de vista, breve comunicação, seção memórias:

- a) **originais**: divulgam resultados de pesquisas que possam ser replicados ou generalizados. Devem ter acima de 5.500 palavras, incluindo o resumo. O texto pode ser apresentado em português ou inglês;
- b) **revisão**: Artigos de Revisão dispensam resumo estruturado. Tamanho máximo: 15 páginas, podendo conter figuras, tabelas ou gráficos. **Ponto de vista**: esta seção tem por objetivo receber artigos que contenham opiniões de autores a respeito de assuntos polêmicos e de interesse para a ciência em animais de laboratório. O texto pode ser apresentado em português ou inglês;
- c) **breve comunicação**: Caso original estudado de relevância com aproximadamente 1.500 palavras, incluindo resumo com não menos que 200 palavras. O texto pode ser apresentado em português ou inglês;
- d) **seção memórias**: relatos sobre a memória da área. Serão convidados os autores para comporem essa seção. O texto pode ser apresentado em português ou inglês.

### Paginação

Os artigos devem conter no máximo 10 laudas (cada lauda = 1.250 caracteres sem espaço), incluindo-se as referências – seguir normas de publicação.

### Folha de Rosto (Identificação)

- a) título e subtítulo – em português e inglês;
- b) nome e sobrenome de cada autor; filiação a qual instituição pertence;
- c) nome do departamento onde o trabalho foi realizado;
- d) nome e endereço eletrônico do autor para correspondência;

- e) se foi baseado em Tese, indicar o título, ano e instituição onde foi apresentada;
- f) se foi apresentado em reunião científica, indicar o evento, local e data de realização;
- g) se foi subvencionado, indicar o tipo de auxílio, nome do agente financeiro e o número do processo;
- h) agradecimentos:
  - contribuições (assessoria científica, coleta e dados, revisão crítica da pesquisa),
  - instituições (apoio econômico, material e outros).

### Estrutura do Texto

**Introdução:** deve ser curta, definindo o problema estudado sintetizando sua importância.

**Material e Métodos:** deve conter os critérios de amostragem e a descrição, breve e clara, dos métodos usados, que permita a compreensão e repetição do trabalho. Processo e Técnicas já publicados devem ser referidos, por citação, a menos que tenham sido modificados. Relatar informações detalhadas sobre os animais e suas condições de criação e manutenção; a eutanásia dos animais deve ser coerente com recomendações contidas nos Guias de Cuidados nacionais e internacionais reconhecidos oficialmente.

**Resultados:** deve se limitar a descrever os resultados encontrados sem incluir interpretações/comparações.

**Discussão:** deve começar apreciando as limitações do estudo, seguida da comparação com a literatura e a interpretação dos autores, extraíndo conclusões, indicando novos caminhos para pesquisa.

**Conclusão:** para os artigos originais. Deve ser fundamentada pela discussão feita sobre os resultados obtidos.

### Resumo e Palavras-Chave

- a) português e inglês (até 250 palavras). Deverá conter objetivo, métodos, resultados e conclusões. Os trabalhos enviados em língua portuguesa terão resumo em língua inglesa e vice-versa;
- b) descritores (usar o vocabulário): Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) - <http://decs.bvs.br/>.

Ilustrações (figuras, quadros, fotografias, desenhos, gráficos, entre outros)

As ilustrações deverão vir logo após as referências (numeradas em ordem consecutiva ao longo do texto); Legendas à parte.

Deverão ser apresentadas, priorizando a compreensão do texto e dos dados. As figuras deverão ser originais em formato jpeg com tamanho 7 cm de largura por 9,5 cm de altura ou 170 pixels de largura por 269 pixels de altura com até 250 Kb. As letras e símbolos devem estar na legenda. As legendas das ilustrações devem permitir sua perfeita compreensão, independentemente do texto.

As ilustrações deverão ser numeradas separadamente, usando algarismo arábico, na ordem de aparecimento no texto. Cada ilustração deverá conter o seu respectivo número e estrutura em discussão, indicada com seta.

### Tabelas

As tabelas também devem ser incluídas no mesmo arquivo, logo após as referências (numeradas em ordem consecutiva ao longo do texto) devem ter título breve.

As legendas das tabelas devem permitir sua perfeita compreensão, independentemente do texto.

As tabelas deverão ser numeradas separadamente, usando algarismo arábico, na ordem de aparecimento no texto. Cada tabela deverá conter o seu respectivo número e estrutura em discussão, indicada com seta.

**Obs:** não usar traços horizontais ou verticais internos.

### Unidades

Seguir as normas do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro) no endereço eletrônico: [www.inmetro.gov.br](http://www.inmetro.gov.br).

### Abreviaturas e Siglas

- a) forma padrão da língua portuguesa e inglesa;
- b) não usar no título e no resumo.

### Agradecimentos ver Folha de Rosto

A quem colaborou de modo significativo na realização do artigo, devem vir antes das referências.

### Citações no Texto

Para citação no texto, utilizar o sistema numérico remetendo à lista de referências ao final do trabalho. A indicação da fonte é feita por uma numeração única e consecutiva, em algarismos arábicos, situada pouco acima da linha do texto em sobrescrito, após a pontuação que encerra a citação.

### Exemplo:

“Os animais de laboratório são definidos por diferentes espécies que são mantidas, ou criadas, em

viveiros como cobaias, chamados biotério”.<sup>1</sup>. Podem ser coelhos, ratos, *hamsters*, entre outros.

Quando for necessário citar o autor, indicar apenas o autor e o número da citação.

#### **Exemplo:**

Para Mendes<sup>2</sup> esses animais são de extrema importância para a ciência.

#### **Referências (Vancouver)**

- a) a elaboração da lista de referências é feita pelo sistema numérico na mesma ordem em que aparecem no texto;
- b) o título do periódico deverá ter seu nome abreviado de acordo com a List of Journals Index in Index Medicus: acessar o endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>;
- c) devem ser citados todos os autores, quando até seis; acima deste número, citam-se os seis primeiros seguidos de et al., separados por vírgula (,).

#### **Exemplos:**

1 Silva EM, Pereira AS, Santos AA, Mendonça RM, Mendes AL, Arruda LJ.

2 Santos AA, Arruda LJ, Couto LP, Mendes AL, Viana BP, Rocha RS, et al.

- d) a exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

Para exemplos de referências que não forem contempladas nestas instruções, acessar o International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) no endereço <http://www.icmje.org>.

#### **Exemplos:**

#### **Artigo de Periódico**

Sans-Coma V, Carmen Fernández M, Fernández B, Durán AC, Anderson RH, Arqué JM. Genetically alike Syrian hamsters display both bifoliate and trifoliate aortic valves. *J Anat.* 2012 Jan;220(1):92-101. doi: 10.1111/j.1469-7580.2011.01440.x.

Datta S, Adak R, Chakraborty P, Haldar AK, Bhattacharjee S, Chakraborty A, et al. Radio-attenuated leishmanial parasites as immunoprophylactic agent against experimental murine visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2012 Jan;130(1):39-47.

#### **Livro**

#### **Mesmo Autor da Obra no Todo**

Hawk CT, Leary SL, Morris TH. *Formulary for laboratory animals*. 3rd ed. Oxford: Blackwell; 2005. 203 p.

#### **Autor distinto da obra no todo**

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995.p. 655-8.

#### **Dissertações/Teses**

Leite DP. Padrão de prescrição para pacientes pediátricos hospitalizados: uma abordagem farmacoepidemiológica [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas ; 1998.

#### **Dissertações/Teses on-line**

Chaguri LCAG. Estudo de um sistema de análise de preferências climáticas para animais convencionais de laboratório por tecnologia de ventilação microambiental e avaliações biológicas. I. Avaliação da eficiência de um protótipo, para o estudo de parâmetros ambientais, resultados parciais verificados em ratos (*Rattus norvegicus*). [tese na Internet]. São Paulo (Brasil): Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2009 [citado 22 fev. 2011]. 109 p. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-07122009-113246/pt-br.php>.

#### **Trabalho Apresentado em Evento**

Costa MSD. Aspectos éticos relacionados à infraestrutura de biotérios em universidades públicas. 28<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 3-6 set. 2011; Águas de Lindoia, BR. São Paulo: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 2011. Resumo PE024.

#### **Trabalho de evento publicado em periódico**

Costa MSD. Aspectos éticos relacionados à infraestrutura de biotérios em universidades públicas. Apresentado à 28<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 3-6 set. 2011; Águas de Lindoia, BR. Anais. (**Braz Oral Res.** 2011;25:57. Resumo PE024.