

**Escola Superior de ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Latu Sensu*
Curso de Especialização em Biotérios**

Cristiane Aparecida Martinho Garramoni

**Acasalamento, criação e avaliação da resposta imune de
camundongos heterogênicos selecionados geneticamente para
resposta de anticorpos (seleção III)**

São Paulo

2022

Cristiane Aparecida Martinho Garramoni

Acasalamento, criação e avaliação da resposta imune de camundongos heterogênicos selecionados geneticamente para resposta de anticorpos (seleção III)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotérios do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a contenção do título de Especialista em Biotérios.

Orientadora: Aryene Trezena

São Paulo

2022

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Garramoni, Cristiane Aparecida Martinho
Acasalamento, criação e avaliação da resposta imune de camundongos heterogênicos selecionados geneticamente para resposta de anticorpos (seleção III) / Cristiane Aparecida Martinho Garramoni ; orientador(a) Aryene Goés Trezena - São Paulo, 2022.
32 p. : il.

Monografia (Especialização) - Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação Lato Sensu - Especialização em biotérios.

1. Produção de anticorpos 2. Linhagens H e L. 3. Anatoxina Diftérica. 4. Imunogenética I. Trezena , Aryene Goés. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação Lato Sensu - Especialização em biotérios. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABN T (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Monitoramento Sanitário de camundongos da Seleção III do Biotério do Laboratório de Imunogenética", protocolada sob o CEUA nº 4837170921 (ID 002442), sob a responsabilidade de **Aryene Goes Trezena e equipe; Cristiane Aparecida Martinho Garramoni; Nancy Starobinas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 28/09/2021.

We certify that the proposal "Sanitary Control of Selection III mice from Immunogenetics laboratory animal facility", utilizing 24 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 4837170921 (ID 002442), under the responsibility of **Aryene Goes Trezena and team; Cristiane Aparecida Martinho Garramoni; Nancy Starobinas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 09/28/2021.

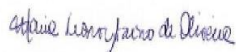
Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 10/2021 a 10/2022 Área: Imunogenética

Origem:	Biotério Imunogenética	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	4 a 12 semanas	N:	12
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 30 g		
Linhagem:	HIII						
Origem:	Biotério Imunogenética	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	4 a 12 semanas	N:	12
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 30 g		
Linhagem:	LIII						

Local do experimento: a coleta das amostras será realizada na sala de experimentação do Biotério da Imunogenética

São Paulo, 28 de setembro de 2021



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "A SÍLICA MESOPOROSA NANOESTRUTURADA COMO VEÍCULO PROTETOR DE VACINAS ADMINISTRADAS PELAS VIAS ORAL E INTRAMUSCULAR", protocolada sob o CEUA nº 2666080319 (ID 001583), sob a responsabilidade de **Aryene Goes Trezena e equipe; Milene Tino; Nayara da Silva Antonio; Viviane Fongaro Botosso; Orlando Garcia Ribeiro Filho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 20/03/2019.

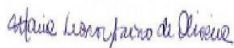
We certify that the proposal "NANOESTRUTURED MESOPOROUS SILICA AS A PROTECTIVE VEHICLE FOR VACCINES ADMINISTERED BY ORAL AND INTRAMUSCULAR ROUTES", utilizing 150 Isogenics mice (males and females), 300 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 2666080319 (ID 001583), under the responsibility of **Aryene Goes Trezena and team; Milene Tino; Nayara da Silva Antonio; Viviane Fongaro Botosso; Orlando Garcia Ribeiro Filho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 03/20/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**Vigência da Proposta: de **04/2019** a **04/2023**Área: **Imunogenética**

Origem:	Biotério Central	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	4 a 8 semanas	N:	150
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	20 a 25 g		
Linhagem:	Balb/c						
Origem:	Biotério Imunogenética	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	4 a 8 semanas	N:	150
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 25 g		
Linhagem:	HIII						
Origem:	Biotério Imunogenética	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	4 a 8 semanas	N:	150
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 25 g		
Linhagem:	LIII						

Local do experimento: Biotério da Imunoquímica e Biotério da Imunogenética

São Paulo, 20 de março de 2019



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu Cristiane Martinho Garramoni, aluna do curso de Especialização em Biotérios, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

Imediato

06 meses

12 meses

Outro prazo: LIVRE. Justifique:

São Paulo, 07 de Março de 2022.



Aluno(a)

Cristiane Aparecida Martinho Garramoni

AGRADECIMENTOS

À diretora da Seção de Imunogenética do Instituto Butantan (IB), pelo apoio e disponibilizando a me ausentar do setor para essa qualificação.

Aos funcionários do biotério: Aline Dias, Brenno Almeida, Pedro Souza e Antônio Neto, pelo incentivo e apoio constantes. Cuja colaboração foi imprescindível na manutenção dos animais na minha ausência.

As professoras/ doutoras, Aryene e Nancy, pelo constante suporte no Biotério e pelo apoio na edição e distribuição deste trabalho.

A minha família e amigos que me apoiam nesta jornada com carinho e incentivo.

A veterinária Glaucie Jussilane Alves pelo incentivo e colaboração na elaboração deste trabalho.

Por fim, somente com extrema dedicação e o profundo conhecimento dos professores, poderia ter gerado um trabalho tão importante para minha vida profissional.

RESUMO

GARRAMONI, Cristiane Martinho. **Acasalamento, criação e avaliação da resposta imune de camundongos heterogênicos selecionados geneticamente para resposta de anticorpos (seleção III)**. 2022. 32p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotérios) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

Os procedimentos aqui descritos, foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), através dos protocolos n° 2666080319 e n° 4837170921.

A Seleção III composta de camundongos geneticamente selecionados para Baixa (L) ou Alta (H) produção de anticorpos contra antígenos bacterianos, foi acompanhada quanto aos processos de acasalamento e criação. Com o objetivo de fazer uma avaliação da resposta diferenciada de anticorpos entre as linhagens H e L, foi realizada a análise da produção de anticorpos desses animais frente à imunização com Anatoxina Diftérica.

Apesar da grande diferença genética dessa linhagem heterogênica em relação a outras linhagens experimentais, a estrutura, o ambiente, a temperatura e a umidade, se faz igualmente proporcionada as demais linhagens localizadas neste laboratório de biossegurança NB1. O processo de criação de camundongos se mantém em ambiente calmo, climatizado, enriquecido de materiais para dinamizar o ambiente, sem mudanças de operadores com frequência para não alterar o odor no ambiente e principalmente tendo uma equipe treinada e qualificada para a execução do manuseio.

Ao formar uma nova geração da linhagem da Seleção III, temos por objetivo fazer uma mistura do fundo genético das linhagens, possibilitando observar a resposta imunológica. As linhagens H e L da seleção III mostraram que quando imunizadas com Anatoxina Diftérica, a função imunológica pode ter características qualitativas e quantitativas distintas, mas com respostas correspondentes ao esperado nas diversas mudanças nas gerações precedentes.

Palavras-chave: Acasalamento. Criação. Avaliação da resposta imune.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.2. Seleção III	9
1.3. Procedimentos do Biotério.....	10
2. DESCRIÇÃO DA PLANTA BAIXA DO BIOTÉRIO	11
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Parâmetros avaliados	15
3.2. Características Físicas.....	16
3.3. Características Comportamentais	16
3.4. Fertilidade.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Materiais.....	17
4.1.1. Animais.....	17
4.2. Métodos.....	18
4.2.1. Acasalamento	18
4.2.2. Separação de casais para obtenção de nova geração	18
4.3. Procedimento de seleção de animais	19
4.4. Produção de animais	20
4.5. Desmame e separação dos filhotes	21
4.6 Imunização dos animais com Anatoxina Diftérica (AD)	21
4.7. Determinação dos títulos de anticorpos anti-diftéricos.....	22
4.8. Delineamento experimental para avaliação sanitária	23
5. DESCARTE	25
6. RESULTADOS.....	26
7. CONCLUSÕES.....	28
REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

Quando seguimos uma pesquisa de experimentação que envolvam animais de laboratório, devemos ter consciência que os animais são dotados de sensibilidade e que sofrem a estímulos de dor e estresse.

Todo procedimento com animais deve seguir o cumprimento das normativas de controle de experimentação animal editada pelo CONCEA, avaliando a relevância na aquisição de conhecimento didático ou ao bem da ciência.

O manejo e vigilância das atividades é controlado desde a criação até o término do experimento, seguindo cuidados com o bem-estar, que está ligado diretamente a sua contribuição nos resultados, reduzindo qualquer tipo de angustia que o animal possa obter até o final do experimento.

A metodologia de avaliação *in vivo* com o passar dos tempos, ficou mais exigente quanto ao uso de animal. Procedimentos sendo revistos, estudos com um nível de exigência de alta qualidade e bem-estar animal são algumas medidas que foram ganhando evidência no mercado.

Mas como prevenir a contaminação secundária? De que forma melhorar a produtividade e atender os resultados com excelência?

A sanitização consiste basicamente no uso de melhores práticas de uso de animais e equipamentos apropriados a fim de reduzir o risco de contaminação de determinado procedimento na experimentação ou no diagnóstico analítico sequenciado ao teste.

Essa avaliação no processo, adota medidas de controle que anulam os fatores de deterioração da saúde e criam condições para proteger a segurança e garantir a produção aos experimentos com qualidade.

Antecedendo ou durante as etapas dentro de uma análise de respostas imunológicas, existem variantes que estão sujeitas à contaminação, que podem ser por agentes químicos ou biológicos.

Os modelos animais possibilitam a geração de grande parte dos conhecimentos em várias áreas da biologia da saúde até o presente. Biotérios são as Instalações onde são produzidos e mantidos estes animais criados especificamente para experimentação. Nestes locais são adotadas barreiras sanitárias para controle tanto do microambiente como qualidade da cama, dieta e hidratação.

O macro ambiente tem componentes como portas e janelas vedadas, filtros de ar, sistema de exaustão, higienização do ambiente e esterilização de materiais. No entanto além desses controles, se faz necessário também o monitoramento sanitário dos animais criados nos biotérios uma vez que infecções subclínicas são comuns e podem causar alterações nos resultados experimentais.

1.2. Seleção III:

O Biotério do Laboratório de Imunogenética iniciou suas funções, a fim de instaurar os procedimentos necessários para a adequação de novas linhagens para a ciência. Em 1976 foi obtida por Siqueira e colaboradores, a Seleção III de camundongos selecionados geneticamente, através de cruzamentos seletivos, para a boa (HIII) ou má (LIII) produção de anticorpos contra antígeno bacteriano.

Da mesma maneira Ibanez (1992) e colaboradores obtiveram a Seleção de Inflamação selecionada para a alta (AIRMAX) ou mínima (AIRMIN) resposta inflamatória aguda contra um agente inflamatório inerte. Dessa forma, foram introduzidos procedimentos preconizados para a criação de camundongos de alta qualidade, as quais se mantêm desde então.

As linhagens de camundongos geneticamente selecionados para produção de anticorpos contra imunógenos naturais, foram obtidas através de cruzamento seletivos bidirecionais a partir de populações geneticamente heterogêneas (Swiss), tendo como característica o fenótipo selecionador de produção ALTA (linhagens H) e BAIXA (linhagens L) de anticorpos. (BIOZZI et al. 1979;1980).

Esses estudos com animais geneticamente selecionados foram iniciados com a finalidade de caracterizar os parâmetros genéticos da fase quantitativa da resposta imune e as modificações induzidas pelo processo de seleção em relação as células imunocompetentes. (BIOZZI et al. 1970)

O laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, mantém seleções independentes de camundongos H e L, as quais foram obtidas com a inoculação de imunógenos distintos e em diferentes esquemas de imunização.

A Seleção III, objeto deste estudo, foi obtida selecionando camundongos para resposta secundária, imunizando-os com antígenos flagelares de *Salmonella typhimurium* e *Samonella oranienburg* administrados alternadamente nas sucessivas gerações (SIQUEIRA et al, 1976).

Os antígenos selecionadores foram inoculados nas sucessivas gerações, sendo que em cada seleção, os títulos de anticorpos produzidos são sempre observados pelos níveis mais elevados nas linhagens H e inferiores nos camundongos L.

Essa característica foi observada na produção quantitativa de anticorpos na boa ou má resposta divergindo progressivamente. Quando, nessas diferentes respostas a separação máxima interlinhagens foi obtida observada através da falta de variações fenotípicas constantes, chegou então a um ponto onde atingiu-se o limite da seleção, ou seja, as linhagens foram consideradas homozigotas para os loci reguladores de produção de anticorpos. (BIOZZI et al., 1980).

1.3. Procedimentos do Biotério na manutenção das linhagens

As informações dos animais do Biotério de Criação, Produção e Experimentação do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan em São Paulo, são alinhados em diversos POPs que são informações a serem seguidas a fim de contribuir com a padronização dos procedimentos do setor.

Os Procedimentos Operacionais Padrão (POP) são divididos em 9 partes distintas.

N°001: Descarte de carcaças de animais utilizados no Biotério do laboratório.

N°002: Lavagem de gaiola de polipropileno para criação e manuseio de camundongos.

N°003: Lavagem e preparo de bebedouro e bicos

N°004: Manuseio da Autoclave

N°005: Eutanásia de neonatos de camundongos em Nitrogênio líquido.

N°006: Eutanásia de animais com Dióxido de Carbono (CO₂)

N°007: Procedimento de paramentação para áreas

N°008: Procedimento de limpeza do Biotério

N°009: Procedimento de manuseio para troca de gaiolas sujas

Com a instauração da criação e produção dos animais de laboratório, o setor elaborou um sistema de reprodução para diferentes linhagens existentes no Biotério o qual teve a aplicação dos conceitos de ética e bem-estar animal.

As orientações para a segurança no trabalho, além das melhorias aplicadas na área de higienização de materiais, como a autoclave para melhorar a qualidade sanitária do ambiente dos animais foram se aprimorando com o passar dos anos.

2. DESCRIÇÃO DA PLANTA BAIXA DO BIOTÉRIO

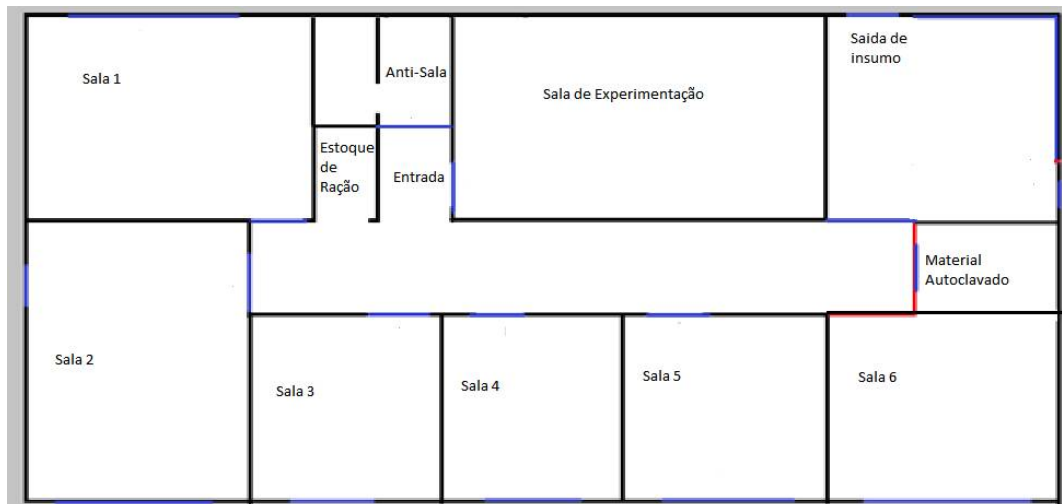
Figura 1: Planta baixa do Biotério, área externa.



Área externa

Fonte: Aluno, 2021.

Figura 2: Planta baixa do Biotério, área interna.



Área interna

Fonte: Aluno, 2021.

LEGENDA DA PLANTA BAIXA:

As instalações do Biotério são divididas em 9 áreas distintas; composta de 6 salas de criação e produção de animais, sendo:

Sala1: Criação da Seleção Inflamação (Airmin/Airmax);

Sala2: Produção da Seleção Inflamação (Airmin/Airmax);

Sala3: Sublinhagem Nramp1 - Criação e Produção da Seleção Inflamação (Airmin/Airmax) - SS e RR;

Sala 4: Criação e produção de camundongos isogênicos da Seleção III Bons e Maus produtores de anticorpos (High/Low);

Sala 5: Criação e produção de camundongos Heterogênicos da Seleção III Bons e Maus produtores de anticorpos (High/Low);

Sala 6: Sublinhagens de camundongos isogênicas da Seleção inflamação (airmin/Airmax);

Sala de Experimentação para técnicas de pesquisa;

Sala de lavagem para limpeza e esterilização de materiais;

Sala de preparo para materiais já limpos e autoclavados.

As áreas não são separadas por barreiras sanitárias, mas dotadas de um sistema de fluxo operacional. Os espaços físicos mantem sistema de ar condicionado. O Biotério não é uma área distinta, sua distribuição operacional é regida com as respectivas chefias do Laboratório de Imunogenética.

Há 9 pesquisadores da comunidade multiusuária da seção que utilizam o Biotério, para experimentação ou para acasalamento e criação dos animais com padrões pré-definidos.

Atualmente, a equipe técnica do biotério é constituída por 5 profissionais, graduados e técnicos, devidamente qualificados na área de atuação e em constante processo de atualização. Além disso, esses profissionais têm clara definição de suas funções, bem como a competência e a responsabilidade necessárias para cumprir seu compromisso institucional

A média de criação e produção anual do Biotério gira em torno de 5 mil animais, que atendem a condições sanitárias, genéticas, nutricionais e ambientais definidas e padronizadas pela Conceia.

Ensaio biológicos realizados na seção de experimentação seguem o Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório, isso permite ao Biotério atuar de acordo com as normas estabelecidas no CEUAIB, atendendo às diretrizes da Resolução Normativa N° 1 de 9 de Julho de 2010.

O estabelecimento do controle sanitário nos animais do Biotério da Imunogenética é necessário, tendo em vista que eles, no presente, não são ainda testados na saída ou remanejamento do biotério de criação e produção para a experimentação. Grande parte dos avanços no conhecimento sobre enfermidades infecciosas, microbiologia, imunologia, farmacologia e patologia tem sido possível graças à existência de modelos experimentais (MOLINARO, 2009).

A importância em monitorar sua saúde consiste controlar variações ambientais no intuito de garantir a reprodutibilidade dos resultados, nos trabalhos de pesquisa. As instalações onde são produzidos e mantidos estes animais de experimentação são denominados biotérios. Neles devem ser produzidas e alojadas espécies animais destinados a atender às atividades de ensino e pesquisa, conforme a missão da instituição. Os biotérios podem se distinguir quanto às atividades neles realizadas.

Nos biotérios de produção são criados animais a partir de matrizes selecionadas para linhagens específicas. Sua edificação deve ocorrer preferencialmente em áreas isoladas distantes dos centros urbanos. Nos biotérios de experimentação são alojados os animais que serão utilizados para ensino e pesquisa. (PEREIRA, T.C. et al., 2012.) As barreiras sanitárias adotadas dependem do padrão sanitário que se pretende obter.

Todas as barreiras devem ser implantadas para proporcionar bem estar ao animal garantindo que nada influencie no resultado do experimento. São fatores importantes o controle do macroambiente (temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade e ruídos), controle do microambiente (qualidade da cama, dieta e

hidratação), instalações adequadas com portas e janelas vedadas, filtros de ar, sistema de exaustão, higienização do ambiente e esterilização de materiais.

As barreiras sanitárias devem ser validadas de forma a assegurar a qualidade dos animais produzidos e/ou utilizados na pesquisa. As infecções subclínicas são muito mais comuns do que as doenças em animais de experimentação, mas ainda assim podem causar alterações nos resultados de experimentos, acarretando perdas econômicas e diminuição da produtividade científica (MOLINARO, 2009). Portanto, um fator essencial para reprodutibilidade e confiabilidade dos protocolos experimentais só é possível através de um monitoramento rigoroso da qualidade sanitária dos animais utilizados na pesquisa biomédica.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo realizar acasalamento específico em linhagem heterogênica da Seleção III para preservar as características de heterogeneidade e produção de anticorpos, fazer o desmame/separação de filhotes para manutenção da linhagem e avaliar sob ponto de vista imunológico, a resposta imune, analisando marcadores genéticos determinantes no controle comparativo em camundongos bons e maus produtores de anticorpos (L e H) através de teste de ELISA para análise da resposta imune primária e secundária frente à imunização com Anatoxina Diftérica.

3.1. Parâmetros avaliados

- Preservação e atenção especial na utilização dos animais no experimento, evitando dor e sofrimento são princípios morais éticos que devem ser previstos, sem comprometer a integridade metodológica da pesquisa

- Analise dos métodos ou dispositivos mais adequados a contenção física do animal para a coleta de amostras ou inoculação, para evitar danos ou desconforto durante a intervenção e que seja feita no menor tempo possível.
- Analise da necessidade de eutanásia durante o experimento quando houver ocorrências de traumas ou injúrias graves cuja recuperação não seja possível.
- Determinação do nível de resposta de anticorpos das linhagens H e L da seleção III frente a imunização com Antígeno Diftérico, por meio de ensaios de ELISA.
- Aplicação das boas práticas para o momento de eutanásia ao final do experimento, cumprindo as diretrizes do manual prático sobre usos de cuidados éticos de animais de laboratório.
- Avaliação do estado sanitário dos animais de pesquisa para monitorar a saúde dos camundongos do Biotério da Imunogenética, a serem utilizados para a experimentação.

3.2. Características físicas:

Durante os experimentos o alojamento é feito na sala de experimentação em estante ventilada, com climatização e umidade controlada, considerando sempre os protocolos de qualidade sanitária exigida pela espécie utilizada.

3.3. Características comportamentais:

O biotério de Imunogenética é preparado para alojar camundongos para acasalamento, produção e experimentação. Tendo sua estrutura adaptada a receber esses animais. Os comportamentos variam de acordo com a circulação de pessoas novas no ambiente.

3.4. Fertilidade:

O sistema de acasalamento é associado a genética da linhagem na colônia fundadora e também nos aspectos físicos de cada animal escolhido. Camundongos possuem cio pós-parto, esse sistema permite o aproveitamento a produção de outra cria em tempo reduzido, podendo estar amamentando uma ninhada e após 21 dias já parir novamente. Sabendo que, nesse procedimento de vida reprodutiva juntos, o casal não deve passar do sexto ciclo gestacional para não haver desgaste do organismo em consequências das crias sucessivas e das simultâneas gestações e lactações.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Gaiolas de polipropileno, tampas de inox, bebedouros, bicos, maravalha de pinos e xilanas da marca *J.R Maravalhas*, Autoclave, filtro de carvão ativado que é um material extremamente poroso que atrai e retém uma grande variedade de contaminantes prejudiciais à saúde dos animais, também é muito eficaz para remover odores da água, principalmente, odores do cloro, ração marca *Nuvilab Quimtia* irradiada.

Pipeta Pasteur de vidro, Microtubo BD Microtainer SST para coleta de sangue, centrífuga, *placas de ELISA de 96 poços* marca *COSTAR high binding* para titulação dos anticorpos.

4.1.1. Animais

Foram utilizados camundongos de aproximadamente 3 meses de idade, machos e fêmeas H e L, da Seleção III heterogênea, geneticamente selecionada para alta (HIII) e baixa (LIII) produção de anticorpos.

Os animais utilizados para este estudo são acasalados, criados e mantidos até sua disponibilização, no Biotério do laboratório de Imunogenética do CDC no Instituto Butantan - SP.

Os modelos animais possibilitam a geração de grande parte dos conhecimentos em várias áreas da biologia da saúde até o presente, são produzidos, mantidos e criados especificamente para experimentação.

Avaliação sanitária nos animais do Biotério da Imunogenética é necessária, para monitorar sua saúde além de controlar variações ambientais inerentes ao Biotério tem o intuito de garantir a reprodutibilidade dos resultados, nos trabalhos de pesquisa.

4.2. Métodos

4.2.1. Acasalamento

Utilizou-se camundongos das linhagens Boa (HIII) e Má (LIII) respondedoras da Seleção III, machos e fêmeas, da geração F124 com idade de 16 a 20 semanas, para cruzamento para obtenção da geração F125.

A Criação e produção desses camundongos Heterogênicos da Seleção III é feita sob a coordenação das pesquisadoras Nancy Starobinas e Aryene Trezena.

4.2.2. Separação de casais para obtenção de nova geração

A formação de uma nova geração/família é constituída em agrupamento da geração anterior sem que os próximos casais tenham qualquer possibilidade de parentesco genético.

Para controlar e gerenciar a produção de animais heterogênicos, deve-se executar as técnicas e etapas fundamentadas e determinadas pelas pesquisadoras. Esses cruzamentos são com animais não consanguíneos e exogâmicos.

São provenientes de acasalamento determinados geneticamente, sendo que o dimensionamento das colônias de camundongos na Seleção III é feito através

da separação dos animais em 8 (oito) casais. Essa separação se antecede com a divisão das famílias, nomeadas em dezenas (10 a 80). Para não haver qualquer tipo de parentesco genético é verificada a geração anterior e descartadas as famílias que tem parentesco consanguíneo.

Com isso é feito outra separação por casais, sendo machos e fêmeas de famílias totalmente diferentes. Formando assim uma nova família com transferência de genes para produzir uma linhagem geneticamente selecionada, mas com fundo genético heterogêneo.

Apesar da modificação induzida nestas linhagens ter ocorrido primordialmente na regulação quantitativa de anticorpos, a amplitude variável desse efeito sugere testes de respostas imunológicas periódicas.

4.3. Procedimento de seleção de animais para acasalamento para a próxima geração:

1° - Dividir as famílias em 8 grupos (10 ao 80)

2° - Pesquisa de famílias sem ocorrência de cruzamento genéticos na geração anterior.

Exemplo:

Família	Parentais	Acasalamentos possíveis
10	10 x 30	20, 50, 60, 70, 80
20	20 x 60	10, 30, 40, 60, 80
30	30 x 80	20, 40, 50, 70, 80
40	50 x 10	20, 30, 50, 70
50	70 x 20	10, 30, 40, 60, 70, 80
60	80 x 50	10, 20, 50, 70
70	60 x 40	10, 30, 40, 50, 60

80 _____ 40 x 50 ----- 10, 20, 30, 50

3° - Confeção dos casais da próxima geração introduzindo a recombinação genética, garantindo o direcionamento do acasalamento de animais heterogênicos.

	Machos		Fêmeas
1-	10	X	60
2-	20	X	10
3-	30	X	50
4-	40	X	20
5-	50	X	80
6-	60	X	70
7-	70	X	40
8-	80	X	30

Após feito esse agrupamento em gaiolas de 30x20x13cm, há aplicação dos dados em etiquetas previamente padronizadas pelos seus responsáveis, os casais são monitorados semanalmente quanto a ocorrência de crias.

4.4. Produção dos animais

A manutenção do controle sanitário é feita duas vezes por semana, com troca de gaiola e bebedouros. O enriquecimento ambiental é mantido por todo o período de acasalamento para o bem-estar dos filhotes.

O período de gestação dura em média 19-21 dias, exceto para fêmeas que estão amamentando, isso gera um alongamento de 6-16 dias.

Após 60 dias o camundongo já está apto a reprodução, alguns sinais de estro podem ser observados já aos 21 dias do nascimento, por esse motivo a separação controlada é de extrema importância para não haver acasalamento entre irmãos

4.5. Desmame e separação dos filhotes

Dias	Características Anatômicas
0	Coloração rósea, marca de leite abdominal, sem pelos, somente vibrissas (Bigodes), olhos fechados e orelhas coladas. Pesando aproximadamente 1,5g.
3	Orelhas decolam da cabeça.
3 - 4	Começam os nascimentos dos pelos.
7	Pelos em todo o corpo.
9	Visualização das mamas nas fêmeas.
Após 10	Os olhos se abrem.
11	Dentes começam a nascer.
15	Começam a alimentação sólida.
18 - 21	Desmame
30 - 40	Sexagem constatada: abertura da vagina ou descida dos testículos.
50 - 60	Maturidade sexual. Aptos para acasalamento, pesando aproximadamente 18-20g

Fonte: aluno, 2021.

4.6. Imunização dos animais com Anatoxina Diftérica (AD)

Os animais em grupos equivalentes de machos e fêmeas foram separados e identificados por caixas, em cada grupo foi constituído de 3 camundongos, sua identificação foi realizada através de marcações no rabo por uma caneta piloto atóxica (animal 0 sem marcação, animal 1 com um traço e animal 2 com 2 traços). Essa marcação foi conferida semanalmente.

A concentração da anatoxina diftérica para inoculação dos animais foi preparada no laboratório, utilizando:

-Uma solução contendo 10µg de Anatoxina Diftérica (AD) + 50µg de Hidróxido de Alumínio (AL++)* para cada animal, diluída em 200µl de PBS (Solução tampão de salina)

*A concentração de Hidróxido de Alumínio (AL++) foi medida, aprovada e liberada pelo setor de Controle de Qualidade Físico-Químico do Instituto Butantan, analisando o valor exato da concentração.

Os animais foram inoculados por via subcutânea ventral, seguindo o esquema de imunização onde os camundongos HIII e LIII receberam duas doses de Anatoxina Diftérica, sendo a primeira dose no dia "0" e a segunda dose 30 dias depois. Os animais foram sangrados pelo plexo orbital no dia 0 denominado Sangria Prévia (SP) e 15 dias após cada inoculação. Para sangria os animais receberam anestesia local com colírio de Cloridrato de proximetacaína 5mg/mL. O sangue foi coletado em tubos (BD Microtainer SST) e centrifugados a 10.000rpm durante 2 minutos. Após a centrifugação o soro foi separado e armazenado em freezer a -20°C até a utilização.

4.7. Determinação dos títulos de anticorpos anti-diftéricos

Para a determinação dos títulos de anticorpos antidiftéricos (IgG), realizou-se o teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Para tal, foram utilizadas microplacas de 96 poços, que foram sensibilizados com 200 µl de solução contendo 5 µg/mL de AD diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, em seguida, as placas foram incubadas por 2h a 37°C.

Após a incubação inicial, a solução de sensibilização foi descartada e o bloqueio feito com PBS 0,05% Tween + 1% BSA em uma nova incubação a 4°C *overnight*. Após a incubação as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS/Tween 0,05% e os soros (50 µl) distribuídos nos poços, submetidos a diluições seriadas e as placas incubadas por 1h a 37°C.

Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS/Tween 0,05% e adicionado aos poços uma solução de anticorpos IgG marcados com peroxidase na diluição de 1:7500. Após mais 1h de incubação a 37°C, seguida de lavagem, foi então adicionado o substrato (OPD) diluído em Tampão Citrato-Fosfato acrescido de 20 µl de Peróxido de hidrogênio.

As placas foram mantidas no escuro por 15 minutos para desenvolvimento da reação que, em seguida, foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2,0N. Por fim, as placas foram lidas no leitor de ELISA com filtro 492nm (BIO-TEK INSTRUMENTS) para determinação da densidade óptica (D.O) das amostras.

4.8. Delineamento experimental para avaliação sanitária:

Animais:

Foram utilizados 12 camundongos HIII e 12 animais LIII em grupos equivalentes de machos e fêmeas.

Foram coletados dos animais vivos sangue e após eutanásia foram coletados, amostras de fezes, pulmão, e secreção da orofaringe, conforme descrito abaixo:

Sangue:

Coletado através de sangria pelo plexo retroorbital, com uso de colírio Anestésico.

Pelos:

Após Eutanásia uma fita adesiva transparente foi pressionada, nas regiões caudal, lombar, cervical, cabeça, ventral e perianal dos animais, no sentido contrário ao nascimento dos pelos.

Fezes:

Após Eutanásia foram coletadas porções do duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto e seus conteúdos intestinais foram removidos por raspagem.

Secreção da orofaringe: foi coletada com auxílio de swab introduzido na região oral e traqueia.

Fragmentos de pulmão:

Após Eutanásia foram retirados com auxílio de tesoura e pinças.

Avaliação Ectoparasitológica:

A avaliação ectoparasitológica foi realizada através do procedimento de decalque com fita gomada, encontrando-se o animal já eutanasiado, pressionando a fita sobre o pelo do animal nas regiões caudal, lombar, cervical, cabeça, ventral e perianal. Após a coleta a fita será colada sobre uma lâmina de vidro e observada ao Microscópio ótico comum.

Avaliação Endoparasitológica:

Após a eutanásia, realizou-se a necropsia para coleta dos segmentos do intestino (duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto). Os conteúdos intestinais foram então removidos através da raspagem da mucosa, homogeneizados e colocados em lâmina de vidro adicionados a uma solução de Lugol 2%. A seguir o esfregaço foi coberto com uma lamínula e observado ao Microscópio ótico comum.

Avaliação Microbiológica:

Após necropsia foi coletado material da região da orofaringe com auxílio de swab introduzido na região oral e traqueia além de fragmentos dos pulmões. Esses materiais foram então colocados em solução Solução Fisiológica contendo Vancomicina e Gentamicina e semeados em meios de Ágar Sangue e também colocados em a solução de Nicotinamida e semeados em meio de Ágar Mc Conkey.

Foi coletado também um raspado intestinal, com auxílio de uma lâmina de vidro, de cada porção do intestino e feito um pool que foi semeado em placas com meios de Ágar Mc Conkey, Ágar XLD e Ágar Cetrimide.

As placas foram incubadas a 37°C durante 24 hs e o crescimento bacteriano foi mensurado através de kits de sistema de Identificação.

5. DESCARTE

Com objetivo de estabelecer o procedimento para o descarte de carcaças de animais utilizados no biotério do laboratório de Imunogenética, utiliza-se o recurso de equipamentos como freezers, caixas acrílicas, manômetro, balança e cilindro de CO₂.

Materiais auxiliares como pano de limpeza para uso laboratorial, papel absorvente macio, pisseta com álcool para limpeza do freezer e bancadas, saco transparente para armazenamento de carcaças de animais, saco branco de infectante para descarte, lacre ou fita, etiqueta para identificação de descarte de carcaças e caderno de controle de descarte de carcaças.

As carcaças devem ser retiradas do freezer do laboratório e do freezer do biotério e embaladas em sacos brancos (Infectante), devendo observar a quantidade de carcaças para que o volume do saco seja ideal, não excedendo 2/3 da capacidade do saco de acordo com as orientações do guia prático de descarte de resíduos, fechar o saco com um lacre ou fita crepe, preencher sem rasuras a etiqueta de "Descarte de carcaças", fornecida pelo estoque da instituição, verificar a quantidade de animais dispensados anotados no caderno de controle de animais e fazer a pesagem para registro interno.

A limpeza das grades dos freezers e bancadas devem ser realizadas imediatamente após o término do procedimento do descarte, secar com pano de limpeza de uso laboratorial para eliminar quaisquer resíduos de material biológico.

O procedimento de entrega das carcaças para o setor de Meio Ambiente é realizado através de envio das informações pela plataforma digital da VGR resíduos <https://app.vgresiduos.com.br>, informando a data e a existência de carcaças a serem retiradas referentes ao Biotério de Imunogenética.

Caso ocorra uma grande quantidade de dispensa de animais e o freezer não comportar as carcaças ou algum problema de eletricidade, deve informado pela plataforma digital a necessidade de uma coleta emergencial e seu motivo

6. RESULTADOS

O acasalamento, criação, desmame, separação e avaliação da resposta imune de camundongos Heterogênicos selecionados geneticamente para resposta de anticorpos (Seleção III), foram feitos com famílias pré-determinadas e foram mantidas a Heterogeneidade genética da seleção. Os filhotes foram separados e marcados de acordo com a família a qual pertence.

A saber

Os filhotes da família 10 foram marcados com número 10, o de família 20 marcados 20 e assim sucessivamente.

Avaliação das condições sanitárias dos animais:

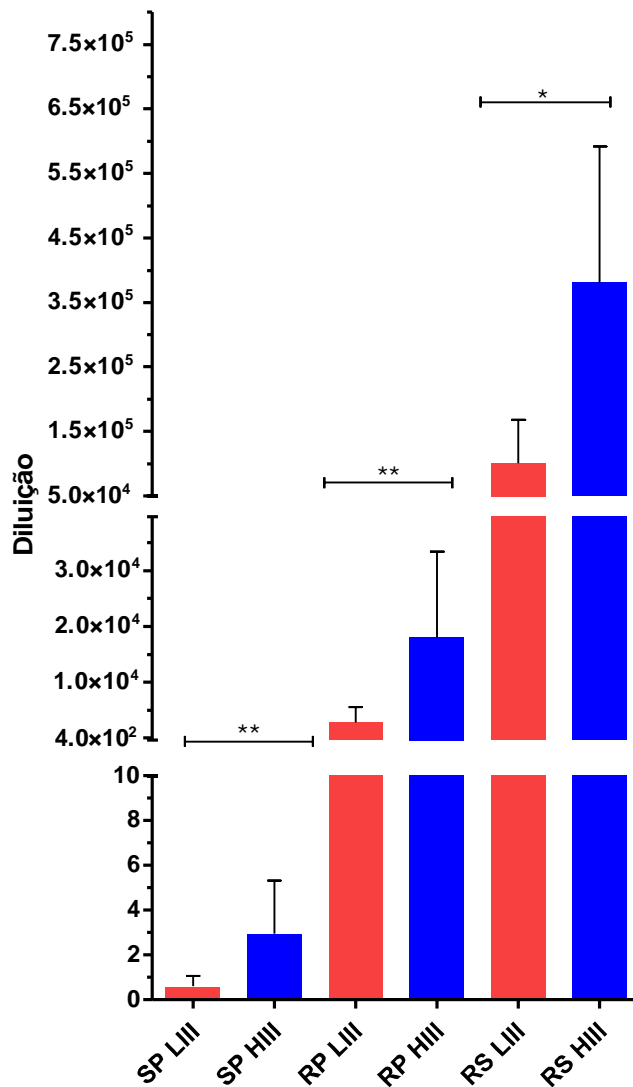
Foram analisados grupos de 3 camundongos L e 3 H machos e 3 L e 3H fêmeas, foram monitoradas sangue, fezes, pelos e fragmento de pulmão submetidos aos testes de infecção endoparasitológica, ectoparasitológica e microbiológica que segundo os resultados das avaliações, não foram observadas variações significantes durante o tempo dos testes, indicando que esses animais podem ser utilizados para experimentação.

Avaliação da produção de anticorpos

Foram analisados os grupos de machos e fêmeas submetidos a imunizações subcutâneas com Anatoxina Diftérica e podemos observar na figura 1 os resultados obtidos. As análises foram feitas nas amostras de soro coletadas 15 dias após a primeira imunização para analisar a resposta primária (RP) e nos mesmos períodos após a dose de reforço para analisar a resposta secundária (RS).

Como visto na figura 1, os camundongos HIII produziram significativamente mais anticorpos que os LIII na resposta primária e na resposta secundária frente ao mesmo estímulo antigênico com anatoxina diftérica.

Figura 3: Produção de anticorpos IgG para Anatoxina Diftérica nos animais HIII e LIII. Os camundongos foram imunizados por via sc com Anatoxina Diftérica e, avaliadas o controle (SP) e as respostas primária (RP) e secundária (RS) (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$)



Fonte: Aluno, Natália Zana, Aryene Trezena, 2021.

7. CONCLUSÕES

Foram mantidos os procedimentos de criação e manutenção com os animais, utilizando o uso de enriquecimento ambiental, onde o principal objetivo foi melhorar o bem-estar animal, estimulando recursos que permitiram comportamentos naturais e típicos da espécie, sendo que esses materiais foram utilizados temporariamente para não serem associados à sua rotina.

Os camundongos sofrem de tédio em ambientes restritos, onde há poucas oportunidades de interação com o ambiente, o que está ligado a mudanças fisiológicas, interferindo nas funções biológicas naturais, o que automaticamente afetaria o estudo da resposta imune.

As condições sanitárias avaliadas mostraram que um controle sanitário efetivo e regulamentado na rotina do plantel representa a efetividade em uma produção mais elevada na qualidade das linhagens.

As linhagens L e H mostraram uma ótima resistência apesar da diferença na sensibilidade da produção de anticorpos.

Os camundongos HIII produziram significativamente mais anticorpos que os LIII, mostrando que a característica geneticamente selecionada de produção diferenciada de anticorpos frente à imunização, está mantida na Seleção.

O monitoramento com a saúde dos animais consistiu em controlar as variações ambientais no setor e de garantir a reprodutibilidade dos resultados, nos trabalhos da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO L.M.M. **Resistência a infecções e resposta imune específica em linhagens de camundongos selecionados geneticamente segunda a reatividade inflamatória aguda.** 1996. Dissertação de Mestrado em Imunologia, ICB-USP. São Paulo, 2018.

BIOTÉRIO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DA FCF-IQ/USP. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.** 2013, 234 p. Disponível em: <http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manual-Cuidados-com-Animais.pdf>

BIOZZI, G., STIFFEL, C., MOUTON, D., BOUTHILLIER, Y., AND DECREUSEFOND, C. Genetic selection for antibody production in mice. *In* H. Peeters (ed.): **Protides of the Biological Fluids**, pp. 161-167, Pergamon Press, Oxford and New York, 1970.

BIOZZI, G. ; MOUTON, D. , SANT'ANNA, O. A. , PASSOS, H. C. , GENNARI, M. , REIS, M. H. , HEUMANN, A. M. , BOUTHILLIER, Y. , IBANEZ, O. M. , STIFFEL, C. , SIQUEIRA, M. Genetics Of Immunoresponsiveness To Natural Antigens In The Mouse. **Current Topics in Microbiology and Immunology.** v. 85, p. 31-98, 1979.

BIOZZI, G; SIQUEIRA, M. , STIFFEL, G. , IBANEZ, O. M. , MOUTON, D. , FERREIRA, V. C.
A. Genetic Selection For Relevant Immunological Functions. **Progress In Immunology**, v. IV, p. 432-457, 1980.

MATTARAIA, V. G. M.; OLIVEIRA, G. M. (*Org.*). **Comportamento de camundongos em biotério.** São Paulo: Polo Gráfica, 2012, 271 p.

IBAÑEZ, O.M., STIFFEL, C., RIBEIRO, O.G., CABRERA, W.K., MASSA, S., DE FRANCO, M., SANT'ANNA, O.A.; DECREUSEFOND, C., MOUTON, D., SIQUEIRA, M., BIOZZI, G. Genetics of non specific immunity. 1. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 2555-2563, 1992.

SECRETARIA DE SAÚDE DE SÃO PAULO. **Manual prático sobre Usos e cuidados éticos de Animais de laboratório**. 1ª edição 2010.

PEREIRA, T.C. **Monitoramento sanitário de colônia de camundongos et al. de BALB/c mantidos em biotério convencional**. PUBVET, Londrina, v. 6, n. 8, Ed. 195, Art. 1310, 2012.

SIQUEIRA M, BANDIREI, A.; REIS, M.S.; SANT'ANNA, O.A.; BIOZZI, G. Selective Breeding of mice for antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of *salmonellae*. **Eur. J. Immunol.**, v. 6, p. 241-9, 1976.

TREZENA, A.G. **Aspectos imunológicos e genéticos envolvidos na resistência à bacterianas em linhagens de camundongos selecionadas para produção de anticorpos**. São Paulo, 1999 (Tese de Doutorado em Imunologia, ICB-USP)