

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Especialização em Biotérios**

Alecio Barbosa Rodrigues

**Análise da urina dos camundongos ofertados com água filtrada e
autoclavada (esterilizada).**

**São Paulo
2022**

Alecio Barbosa Rodrigues

Análise da urina dos camundongos ofertados com água filtrada e autoclavada (esterilizada).

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 obtenção do título de Especialista em Biotérios.

Orientadora: Regiane Marinho da Silva

Coorientador: Allan Rodrigo Callarga

São Paulo

2022

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

Rodrigues, Alecio Barbosa

Análise da urina dos camundongos ofertados com água filtrada e autoclavada (esterilizada). / Alecio Barbosa Rodrigues ; orientador(a) Regiane Marinho Da Silva, coorientador(a): Allan Rodrigo Callarga - São Paulo, 2022.

30 p.

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

1. Autoclave 2. Camundongo. 3. Esterilização. 4. Água I. Da Silva, Regiane Marinho. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação Lato Sensu - Especialização em biotérios. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Alecio Barbosa Rodrigues, aluno(a) 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 _____ Justifique:

São Paulo, 19 de dezembro de 2022

.....
aluno(a)

De acordo:.....
Orientador(a):

Regiane Marinho do Lago

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto Butantan, a ESIB, a Dr^o(a). Carla Baptistão pela oportunidade de realizar essa especialização, para Dr^o(a) Vânia Gomes pela oportunidade de fazer o estágio no Biotério Central, a Dr^o(a) Regiane Marinho e ao Allan Calarga pela orientação e todos os ensinamentos. A toda equipe do Biotério Central pela incrível recepção, aos professores que ministraram durante o curso e a todos os colegas de sala.

“Se você quer fazer do mundo um lugar melhor, antes de tudo, mude a si mesmo”.

Michael Joseph Jackson

RESUMO

RODRIGUES, Alecio Barbosa. **Análise da urina dos camundongos ofertados com água filtrada e autoclavada (esterilizada)**. 2022. 31 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotérios) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

A água é considerada uma das mais importantes preocupações no mundo no que se refere ao uso à sua manutenção como um bem universal. Considera-se água potável quando ela não oferece nenhum risco à saúde, está livre de agentes químicos e biológicos nocivos à saúde humana e animal, estando assim, própria para consumo. A oferta de água em biotérios, seja ele de experimentação ou de produção, podem não apresentar a qualidade de água que seja satisfatória para o consumo, pois a oferta vem do sistema de tratamento de água e esgoto, que ainda podem conter microorganismos e resíduos, como ferro, cloro, metais pesados e até outros organismos nocivos à saúde animal. Os biotérios contam com sistemas físicos e químicos como autoclavação, filtração, cloração e acidificação para conter a quantidade de resíduos e agentes infecciosos na água ofertada aos animais e a rotina laboratorial (LENA DE SÁ, *et al.* 2001). Os processos químicos exigem a necessidade de testes regulares para a validação da água, garantindo a qualidade para ingestão animal. Já a filtração, que é um método físico, consegue barrar substâncias indesejáveis por meio de granulação (areia e carbono) e a esterilização por autoclave se tornam mais utilizados (KURTZ, *et al.* 2020). Nos biotérios, sejam eles de experimentação ou criação, além da filtração, a autoclave torna-se um dos itens indispensáveis, pois há a exigência que os animais não sofram interferências externas a ponto de prejudicar ou alterar os resultados dos experimentos NORMATIVA Nº 33 CONCEA 2016. O presente projeto teve como objetivo comparar amostras de água, ofertadas para camundongos, que passaram pelo processo de filtração e autoclavada, e determinar os parâmetros das amostras de urina. Os resultados da análise de água foram idênticos entre ambas as amostras e os valores dos marcadores de fita reativa na urina, mostraram resultados dentro dos valores de referência, demonstrando que água filtrada ou a água autoclavada são eficazes para manter a saúde dos animais.

Palavras-chave: Filtração. Esterilização. pH. Fita reativa. Água. Camundongo. Autoclave.

ABSTRACT

RODRIGUES, Alecio Barboda. **Urine analysis of mice offered with filtered and autoclaved (sterilized) water**. 2002. 31 p. monograph (Specialist in Bioterium) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

Water is considered one of the most important concerns in the world in terms of its use and maintenance as a universal good. Drinking water is considered when it poses no risk to health, is free of chemical and biological agents harmful to human and animal health, and is therefore fit for consumption. The supply of water in vivariums, whether for experimentation or production, may not present a water quality that is satisfactory for consumption, as the supply comes from the water and sewage treatment system, which may still contain microorganisms and residues, such as iron, chlorine, heavy metals and even other organisms harmful to animal health. The vivariums have physical and chemical systems such as autoclaving, filtration, chlorination and acidification to contain the amount of waste and infectious agents in the water offered to the animals and the laboratory routine (LENA DE SÁ, *et al.* 2001). Chemical processes require the need for regular tests to validate the water, ensuring quality for animal ingestion. Filtration, which is a physical method, manages to block undesirable substances through granulation (sand and carbon) and autoclave sterilization becomes more used. (KURTZ, *et al.* 2020). In vivariums, whether for experimentation or creation, in addition to filtration, the autoclave becomes one of the indispensable items, as there is a requirement that the animals do not suffer external interference to the point of harming or altering the results of the experiments. NORMATIVA Nº33 CONCEA, 2016. The present project aimed to compare water samples, offered to mice, which went through the filtration and autoclaved process, and to determine the parameters of the urine samples. The results of the water analysis were identical between both samples and the values of the reactive strip markers in the urine, showed results within the reference values, demonstrating that filtered water or autoclaved water is effective to maintain the health of the animals.

Keywords: Filtration. Sterilization. pH. Reagent strip. Water. Mouse. Autoclave.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fita Reativa SENSI 10	20
Figura 2 - Autoclave Baumer HIV VAC	20
Figura 3 - Análise do pH da urina dos animais que receberam água filtrada e autoclavada	24
Figura 4 - Análise da densidade da urina dos animais que receberam água filtrada e autoclavada	25
Figura 5 - Análise de proteína em urina dos animais que receberam água filtrada e água autoclavada	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C°	Graus Celsius
pH	Potencial de Hidrogênio
UR	Umidade Relativa
mL	Mililitro
g/L	Gramas por litro
mg/dl	Miligramas por decilitro
UI/dl	Unidades por decilitro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA IB	Comissão de Ética de Uso de Animais do Instituto Butantan

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado dos testes em fita reativa das amostras de água	23
Tabela 2 - resultado de teste em fita reativa das amostras de urina dos animais ...	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Autoclave	14
1.2. Biotérios de Camundongos	15
1.3. Tiras reativas	16
2. OBJETIVO	17
2.1. Objetivo gerais	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Materiais	19
3.1.1. Animais	19
3.1.2. Materiais Auxiliares	19
3.1.3. Equipamentos	19
3.2. Metodologia	20
3.2.1. Delineamento Experimental	21
3.2.2. Bebedouros com água filtradas e autoclavadas	21
3.2.3. Coleta de água para análises	22
3.2.4. Coleta de urina para análises	22
4. RESULTADOS	22
4.1. Análise da água potável e água esterilizada	22
4.2. Análise urinária	23
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

A água é considerada uma das mais importantes preocupações no mundo, no que se refere ao uso, à sua manutenção como um bem universal, em quantidade e qualidade adequadas. A atenção das entidades sanitárias para com o sistema público de abastecimento de água, o descarte de dejetos, tratamento de vias de esgoto, coleta e disposição de resíduos, principalmente nas grandes cidades, estariam direcionadas para os problemas deste contexto, e o quanto são capazes de causar ao meio ambiente e à saúde pública. Já é realidade em nosso país, a instalação de meios para garantir a qualidade da água destinada ao consumo humano sob a responsabilidade dos três níveis governamentais, sendo parte integrante da vigilância ambiental em saúde (LENA DE SÁ; *et al.* 2001).

Considera-se água potável quando ela não oferece nenhum risco à saúde, está livre de agentes químicos e biológicos nocivos à saúde humana e animal, estando assim, própria para o consumo. Dentro de um laboratório, o uso de água potável em diferentes gradientes de pureza, se tornam indispensáveis desde as técnicas laboratoriais simples ou complexas, até o consumo dos animais, sejam eles usados para a criação, ou experimentação. A água potável na criação e manutenção dos animais de laboratório é de extrema importância e está intimamente ligada às 5 liberdades dos animais, (livres de fome, sede, dor, doença e medo) garantindo que o animal tenha liberdade fisiológica. (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NORMATIVA Nº 33 – CONCEA; 2016).

Os biotérios contam com sistemas físicos e químicos para conter a quantidade de resíduos e agentes infecciosos na água ofertada aos animais, uma vez que, o Conselho de controle de experimentação animal (CONCEA na sua normativa de número 33), sugere que a água ofertada aos animais deve ter índices de agentes químicos e biológicos aceitáveis, para não comprometer a saúde e bem estar dos animais, a não ser que sejam relacionados ao objeto de estudo em particular (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA; 2016).

Existem algumas técnicas para obtenção de água potável para o consumo dos animais criados e mantidos em biotérios. A primeira delas é a filtração, onde por

meio de uma rede de membranas sintéticas e ou de carvão ativado, particulados, agentes químicos e biológicos podem ser retidos. A irradiação por ultravioleta também é uma técnica aplicável, assim como os métodos químicos como coloração e acidificação, entretanto, comprometendo a ingestão dos animais, por causar alteração no pH da água. Então a mais viável e eficaz dentro de uma rotina de grande produção acaba sendo a esterilização (KURTZ; D.M.; *et al*; 2020). A esterilização (do latim *sterellis*, que significa “*improdutivo, incapaz de gerar*”) é uma das técnicas mais eficazes utilizadas em ambiente laboratorial, ou de biotério de produção e de experimentação animal OXFORD LANGUAGES AND GOOGLE.

1.1. Autoclave

A existência da bactéria já era considerada antes mesmo da sua descoberta, em que só pôde ser provada a partir da criação do microscópio. Após essa comprovação, a antiga questão da geração espontânea voltou a ser debatida, até que Louis Pasteur colocou um fim, depois de experimentos realizados, onde provou a existência de microrganismos presentes no ar, responsáveis por causar mudanças em soluções estéreis, concluindo, que a esterilização através da fervura impedia essa contaminação após a incubação. Posteriormente, descobriu-se que alguns organismos eram capazes de resistir a prolongados períodos de fervura à 100°C, Pasteur então viu-se forçado a elevar a temperatura de fervura para 108°C à 120°C, entretanto, para isso, ele teve que desenvolver equipamentos capazes de atingir essa temperatura, foi então que Charles Chamberland, seu colaborador, em 1880, desenvolveu o primeiro esterilizador à pressão de vapor, a *autoclave Chamberland*, em que era possível alcançar e ultrapassar 120°C (BLOG Splabor: “ A história da autoclave”; 2017).

As autoclaves atuais conhecidas são as gravitacionais, que por pressão, o ar é deslocado para o dreno pela a gravidade, porém deixando a saída de ar incompleta e limitando a entrada de calor, e a autoclave pré vácuo, mais eficazes pois proporcionam melhor aquecimento. Segundo BEARSS; 2017, a esterilização por vapor é mais eficaz, tendo a capacidade de destruir microrganismos de forma efetiva, graças a desnaturação de proteínas provocada pelo calor. A técnica consiste em elevar a temperatura a 121°C por 15 minutos, tempo suficiente para ocorrer a desnaturação proteica de microrganismos.

1.2. Biotérios de Camundongos

Nos biotérios, sejam eles de experimentação ou criação, a autoclave torna-se um dos itens indispensáveis, pois há a exigência que os animais não sofram interferências externas a ponto de prejudicar ou alterar os resultados de experimentações.

A puberdade em camundongos ocorre entres os 40 e 50 dias de vida e maturidade sexual entre os 50 e 60 dias (ANDRADE; A. 1966).

A vida reprodutiva dos camundongos é correlacionada com o aumento de hormônios sexuais, como a progesterona em fêmeas e a testosterona em machos. É observado que estes hormônios se elevam em até 75% entre a 4^o e 6^o semana de vida, e estabilizando entre a 8^o e 10^o semana de vida. (OLIVEIRA; G. 2012).

A urina em camundongos, diferentes de em humanos, desempenham funções dentro da reprodução e no comportamento social, ao exalar feromônios. Roedores machos adultos secretam uma quantidade maior de urina em relação às fêmeas, podendo sugerir que a na micção também secretem andrógenos, assim sendo notados por fêmeas e outros machos, possivelmente, interferindo diretamente no seu comportamento social (marcação de território), sexual e reprodutivo dentro de seu ciclo de vida (ACHIMARAN; S. 2002).

A descontaminação da água, além de ser essencial para garantir água potável dentro dos biotérios, podem nos dar importantes respostas, como as alterações do potencial de hidrogênio na alimentação dos animais podem alterar a microbiota intestinal e o metabolismo de camundongos (WHIPPLE; 2021)

A avaliação da variação de potencial de hidrogênio (pH), densidade e proteinúria e os outros valores aferidos em fita reativa, seriam uma “porta de entrada” para avaliar a condição homeostática do animal pois, variações de pH podem sinalizar desde mudanças alimentares até o desgaste muscular, formação de cristais de oxalato de cálcio, gerando patologias renais, infecções sistêmicas, podendo causar alterações ou até tornando inviável o uso destes animais em experimentação (KAMEL; K.S *et al*; 2002).

1.3. Tiras reativas

As tiras reativas na urinálise são um dos métodos mais eficazes e de baixo custo dentro da rotina laboratorial. É capaz realizar análises bioquímicas de importância clínica, como pH, proteínas, glicose, corpos cetônicos, hemoglobina, bilirrubina, urobilinogênio, nitrito, densidade e leucócitos, sendo assim, utilizadas no auxílio do diagnóstico de várias doenças do trato urinário. (STRASINGER; 1996).

Bilirrubina: A presença de bilirrubina na urina pode ser a indicação de uma alteração hepática, uso prolongado de antibióticos e lesão de vesícula. Valores de referência: Negativo (EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES; 2000).

Corpos Cetônicos: Está relacionada ao metabolismo dos carboidratos, sua detecção pode sugerir deficiência alimentar, gerando a perda do carboidrato ou até uma acidose diabética. Valores de referência: Negativo (EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES; 2000).

Densidade: A densidade específica alterada demonstra a capacidade osmótica da urina, revelando a capacidade do rim em concentrar ou diluir a urina. Valores de referência: 1001 a 1035 (EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES; 2000).

Glicose: A presença elevada de glicose na urina pode ser um indicativo de *diabetes mellitus* tipo I e II, diabetes gestacional e distúrbios de tireóide. Valores de referência: menor ou igual a 50mg/dl (EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES; 2000).

Leucócitos: É o indicativo de possível infecção do trato urinário quando presente, devendo sempre estar relacionado com a sedimentoscopia e urocultura da amostra. Valores de referência: Negativo (EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES; 2000).

Nitrito: É o produto do metabolismo do nitrato gerado pelas bactérias no trato urinário. Correlacionado com a presença de leucócitos, é um indicativo de doenças como cistite e pielonefrite. Valores de referência: Negativo (EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES; 2000).

pH: O pH urinário apesar de não estar relacionado ao pH sanguíneo, se relaciona com a alimentação, armazenamento da urina ou até possíveis infecções, tendo como valores de referência entre 4,5 a 8,5 (ANDRADE O.V; 2017).

Proteína: As tiras reagentes fazem a análise semiquantitativa de proteínas na urina, sendo que a proteína dominante é a albumina. Pequenas quantidades de proteína na urina são normais, porém, devendo ser correlacionadas com a densidade específica. Valores de referência: Menores ou iguais a 30mg/dl (MAGNUS L. DALMOLIN; 2011).

Urobilinogênio: O urobilinogênio, é o produto encontrado no final do metabolismo da bilirrubina, uma parte é excretada nas fezes (estercobilinogênio), e outra parte na urina, sendo assim normal aparecer em pequenas quantidades. As disfunções hepáticas e distúrbios hemolíticos, geram uma quantidade maior de urobilinogênio na urina, seus valores de referência estão entre 0,1 a 1UI/dl (EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES; 2000).

Sangue/hemoglobina: A presença de sangue na urina, seja em forma de eritrócitos íntegros ou de hemoglobina, indica que há sangramento em qualquer parte do trato urinário, ou produto da menstruação em fêmeas. A forte presença de hemoglobina também pode indicar alguma doença renal. Valores de referência: Negativo (EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES; 2000).

O projeto busca avaliar como a qualidade da água, um dos mais importantes itens para a manutenção dos animais, podem interferir ou não, quando passam pelo processo de esterilização.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente projeto teve como objetivo comparar amostras de água, ofertadas para camundongos, que passaram pelo processo de filtração e autoclavada, e determinar os parâmetros das amostras de urina.

2.2. Objetivo específico

Comparar o pH, densidade e proteína das amostras de água e analisar os parâmetros de pH, leucócitos, urobilinogênio, bilirrubina, sangue oculto, nitritos, densidade específica, proteína, glicose e cetona nas amostras de urina dos camundongos que receberam água filtrada e água autoclavada dos animais criados e mantidos no Biotério Central do Instituto Butantan.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos heterogênicos *Swiss* (20 machos e 20 fêmeas) com peso entre 20-30 gramas, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan.

Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (20°C - 26°C), umidade (40% - 60% UR), controle de ruído e iluminação artificial (ciclo de 12h luz/12h escuridão), com livre acesso a água e ração, seguindo a resolução normativa número 57 do CONCEA.

Os camundongos foram mantidos em grupos com 5 animais por gaiola (medidas: 30x20x13cm). As gaiolas foram preparadas e trocadas de acordo com o POP - PREPARO DE GAIOLAS E BEBEDOUROS PARA CRIAÇÃO DE ANIMAIS (IB/POP/BIC/CDA/GER-0003).

3.1.2. Materiais auxiliares

Foram utilizados no experimento as fitas reagentes para análise urinária aferindo 10 parâmetros, (*SENSITIVE - SENSI 10*), como ilustrado na figura A. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno para camundongos; tampa de aço inox; gaiolas microisoladoras para camundongos; bebedouros de 250 mL; ração *CR1* (específica para camundongos). Para coleta das amostras foram utilizadas pipetas automáticas de 1000 mL, ponteira para pipeta automática de 1000 mL; tubo *falcon* de 15 mL, paletes de polietileno e papel de grau cirúrgico.

Figura 1: Fita reativa SENSI 10



Fonte: Próprio autor, 2022.

3.1.3. Equipamentos

Autoclave a vapor utilizada na esterilização dos microisoladores e água (Figura 2).

Figura 2 - Autoclave Baumer HIV VAC



Fonte: Próprio autor, 2022.

3.2. Metodologia

3.2.1. Delineamento experimental

Para o desenvolvimento deste estudo, os animais foram divididos em 4 grupos com 5 animais por gaiola:

- a) Grupo 1 - 5 machos e 5 fêmeas que receberam água filtrada em gaiola de polipropileno (aberta) até o desmame (21 dias).
- b) Grupo 2 - 5 machos e 5 fêmeas que receberam água filtrada em gaiola polipropileno (aberta) desde o desmame (21 dias), até a idade adulta (60 dias).
- c) Grupo 3 - 5 machos e 5 fêmeas que receberam água autoclavada em microisolador, (gaiola fechada) até o desmame (21 dias).
- d) Grupo 4 - 5 machos e 5 fêmeas que receberam água autoclavada em microisolador (gaiola fechada) desde o desmame (21 dias), até a idade adulta (60 dias).

Estudo aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais do Instituto Butantan, sob o número de **CEUA IB 6174211022**.

3.2.2. Bebedouros com água filtrada e autoclavada

Os bebedouros com água para microisoladores foram autoclavados em cestos de aço inox com capacidade máxima para 24 bebedouros, embalados com papel grau cirúrgico para evitar contaminação dos frascos de acordo com o POP - ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS (IB/POP/BIC/GER/GER-0016).

Os cestos com os bebedouros foram colocados na autoclave, usando vapor para elevar a temperatura a 121°C por 30 minutos para esterilização da água. Após o processo de esterilização os cestos com os bebedouros ficaram no palete localizado na sala de preparo até esfriar totalmente os mesmos.

Os bebedouros vazios para as gaiolas de polipropileno (gaiola aberta) para camundongos foram autoclavados de acordo com o que está descrito com o POP-ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS (IB/POP/BIC/GER/GER-0016) e posteriormente preparados utilizando água com filtragem de 3mm, de acordo com o POP - PREPARO DE GAIOLAS E BEBEDOUROS PARA CRIAÇÃO DE ANIMAIS (IB/POP/BIC/CDA/GER-0003) e ofertados aos animais.

3.2.3. Coleta da água para análises

As amostras de água foram coletadas dos bebedouros com água filtrada e água autoclavada, com o auxílio de uma pipeta automática de 1000 mL e adicionadas nos tubos falcon de 15 mL, identificados de acordo com o tipo de água e posteriormente analisadas através de tiras reagentes de urina para verificar o pH das amostras. As coletas foram realizadas em 24 de novembro de 2022 e os bebedouros foram inseridos nas gaiolas em 21 de novembro de 2022.

3.2.4. Coleta de urina para análises

A urina foi coletada por micção voluntária, para tanto, os animais foram colocados temporariamente (curto período) em uma gaiola sem forração e limpa (um animal por gaiola), com livre acesso a água e ração. Após a micção, o animal foi retirado e alojado em sua gaiola de origem e as amostras de urina foram coletadas com o auxílio de uma pipeta automática e adicionadas no tubo *falcon* de 15 mL. Posteriormente as amostras de urina foram analisadas através de tiras reagentes de urina, com os seguintes parâmetros: cor, leucócitos, urobilinogênio, bilirrubina, hemoglobina, nitritos, pH, densidade específica, proteína, glicose e corpos cetônicos. Os animais de 60 dias excretavam em média 2 ml e de 21 dias 1 ml de urina, sendo entregues de volta a gaiola quando tínhamos a quantidade mínima para utilizar nas fitas

4. RESULTADOS

4.1. Análise da água filtrada e água autoclavada (esterilizada)

Com os resultados das análises em água filtrada e água autoclavada com a utilização da tira reativa, observa-se que o processo de esterilização não alterou o pH e densidade da água autoclavada quando comparada com água filtrada.

Os resultados mostram que as amostras apresentam os mesmos parâmetros, sendo o seu pH 6.0 e a densidade em 1000. Ambas amostras se mantiveram transparentes, sem nenhum sinal de turbidez ou sedimentação.

Os demais parâmetros analisados apresentaram resultados negativos tanto na água filtrada como na água autoclavada (Tabela 1), como o esperado, uma vez que, esses parâmetros não estão presentes em amostras de água filtrada e autoclavada.

Tabela 1- Análise das tiras reativas entre as amostras de água.

Parâmetros bioquímicos	Água filtrada (Gaiola de polipropileno)	Água esterilizada (Microisolador)
pH	6.0	6.0
Densidade	1000	1000
Leucócitos	Negativo	Negativo
Urobilinogênio	Negativo	Negativo
Bilirrubina	Negativo	Negativo
Hemoglobina	Negativo	Negativo
Nitrito	Negativo	Negativo
pH	Negativo	Negativo
Densidade	Negativo	Negativo
Proteína	Negativo	Negativo
Glicose	Negativo	Negativo
Corpos cetônicos	Negativo	Negativo

Fonte: Próprio Autor, 2022

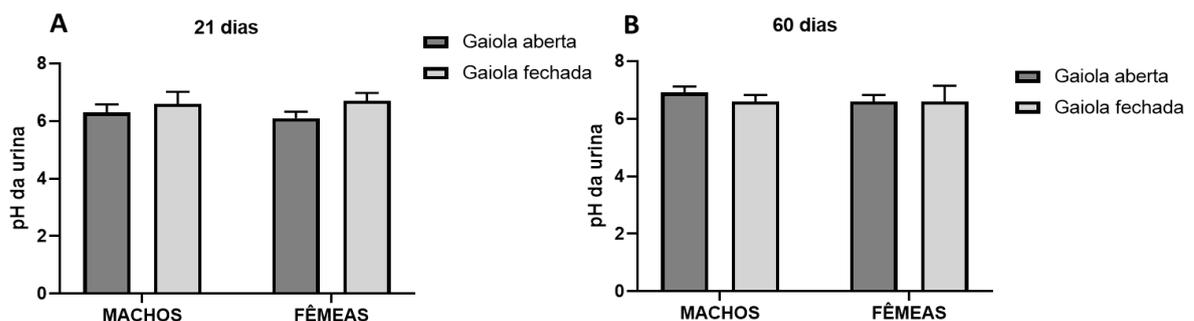
4.2. Análise urinária

As amostras de urina coletadas dos animais que receberam água filtrada e autoclavada desde o desmame até a idade adulta, apresentaram coloração amarelo claro, ou seja, sem alteração na coloração e odor *Sui generis*. Assim como a cor, a turbidez também não foi alterada. Portanto, a água ofertada aos animais não alterou o consumo, uma vez que os animais não apresentaram urina escura, que poderia ser um indicativo de desidratação. Todas as amostras apresentaram cor amarela e os valores das tiras reativas estão dentro dos padrões de referência (DALMOLIN L. MAGNUS; 2011 e EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES; 2000). Assim como a cor, a turbidez também não apresentou alteração nas amostras de urina do animal independente do grupo experimental.

Observamos que os animais com 60 dias excretam quantidade superior de urina, em comparação aos animais com 21 dias de vida.

Na figura 1 mostra que o pH da urina tem variação de acordo com o equilíbrio ácido-base de 6.5 a 7.0, independente do grupo experimental. O pH da urina varia de acordo com o equilíbrio ácido-base e pode variar de 5.0 a 8.0 em indivíduos saudáveis. Portanto, o fornecimento de água filtrada e autoclavada independente do tempo e tipo de gaiola (aberta e fechada) não alterou o pH da urina dos grupos experimentais.

Figura 3. Análise do pH da urina dos animais que receberam água filtrada (gaiola aberta) e água autoclavada (gaiola fechada) por 21 dias (A) e dos animais que receberam água filtrada (gaiola aberta) e água autoclavada (gaiola fechada) por 60 dias (B) .

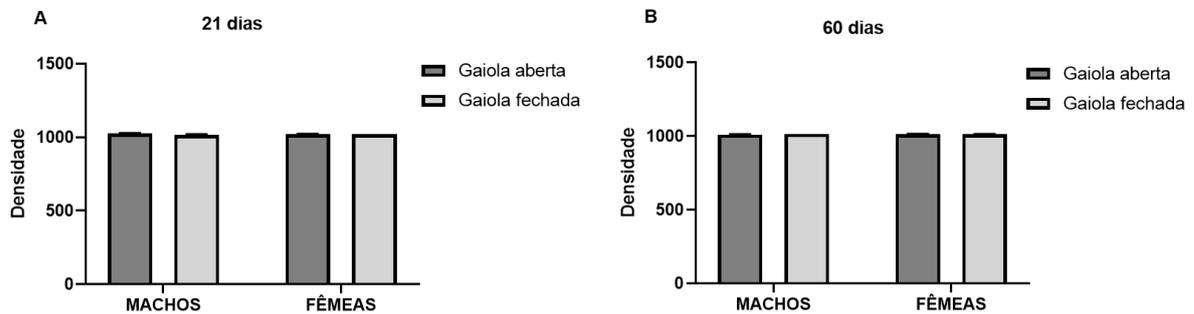


Legenda: Os valores representam a média \pm erro padrão da média.

Fonte: Próprio autor, 2022.

Nas Figuras 2A e 2B estão representadas as concentrações da densidade em amostras de urina dos animais que receberam água filtrada por 21 dias e 60 dias (gaiola aberta) e água autoclavada por 21 dias e 60 dias (gaiola fechada). Observa-se a variação de densidade entre 1010 e 1015 independente do tempo e tipo de água ofertada. Portanto, o fornecimento de água filtrada e autoclavada não alterou a densidade das amostras urinárias dos grupos experimentais.

Figura 4: Análise da densidade da urina dos animais que receberam água filtrada (gaiola aberta) e água autoclavada (gaiola fechada) por 21 dias (A) e dos animais que receberam água filtrada (gaiola aberta) e água autoclavada (gaiola fechada) por 60 dias (B).

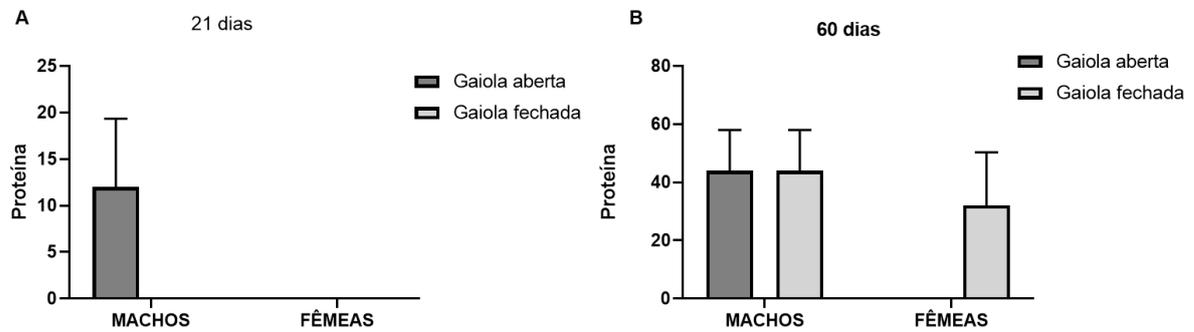


Legenda: Os valores representam a média \pm erro padrão da média.

Fonte: Próprio autor, 2022.

Nos números obtidos de proteína, apenas dois animais machos de 21 dias apresentaram valor igual a 30 mg/dl, apresentando-se dentro dos valores de referência, portanto não havendo relevância clínica. Os demais resultados tiveram valores negativos.

Figura 5: Análise da proteína em urina dos animais que receberam água filtrada (gaiola aberta) e água autoclavada (gaiola fechada) por 21 dias (A) e dos animais que receberam água filtrada (gaiola aberta) e água autoclavada (gaiola fechada) por 60 dias (B) .



Legenda: Os valores representam a média \pm erro padrão da média.

Fonte: Próprio autor, 2022.

A tabela 2 mostra que os parâmetros de leucócitos, urobilinogênio, bilirrubina, hemoglobina, nitrito, glicose e corpos cetônicos, não apresentaram valores positivos e significativos para a análise amostral. Portanto, o processo físico como autoclavação e filtração para obtenção de água livre de patógenos e microrganismos não alterou os parâmetros fisiológicos dos animais.

Tabela 2 - Parâmetros da tira reativa SENSI 10.

	21 dias		60 dias dias	
	Gaiola aberta	Gaiola fechada	Gaiola aberta	Gaiola fechada
Leucócitos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Urobilinogênio	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Bilirrubina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hemoglobina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Nitrito	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Glicose	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Corpos cetônicos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Fonte: Próprio autor, 2022.

5. DISCUSSÃO

Os animais foram avaliados e segundo os valores de referência descritos pela EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES, não apresentaram alterações significativas. Parâmetros como leucócitos, bilirrubina, glicose, urobilinogênio, corpos cetônicos, hemoglobina e nitrito avaliados, apresentaram resultados negativos. Todos os animais apresentam condições saudáveis e gozam das 5 liberdades dos animais, (livres de fome, sede, dor, doença e medo) garantindo que o animal tenha todas as condições saudáveis desde a sua concepção até a sua destinação final como preconiza o CONCEA; 2016. Houve apenas variações em valores de pH, densidade e proteína, entretanto, todos dentro dos valores de referência (ANDRADE O.V *et al*, 2020).

O pH urinário tem variação entre 5.0 a 8.0 e pode ser alterado pela dieta, alimentação recente e tempo de retenção na bexiga, ou mesmo uma infecção bacteriana, porém deve ser correlacionada com a alteração de outros marcadores da fita reativa. A coloração de urina de todos os animais foi de cor amarelo clara, sem turbidez e odor característico (*Sui generis*). Segundo os autores, a coloração da urina está diretamente relacionada à sua concentração, ou seja, quanto mais turva mais concentrada. Sua coloração pode sofrer interferência de alimentos, medicações ou patologias (JOHNSON; FEEHALLY; FLOEGE, 2016).

A densidade está relacionada à quantidade de íons, atuando no equilíbrio osmótico. Uma densidade baixa estaria relacionada a diabetes ou disfunção renal tubular, e valores altos podem configurar a perda de eletrólitos como sódio e potássio. (HIREN, PATEL; 2006). Os valores de densidades encontrados nas amostras variaram entre 1010 e 1015 .

A presença de proteína na urina em quantidades elevadas na urina indica uma possível patologia renal, devido a má capacidade de filtração pelos rins. Entretanto, alterações fisiológicas como febre, exercícios físicos, também pode haver a excreção de proteínas na urina (SILVA; J.P.M 2014). Os valores das amostras foram preponderantemente negativas.

6. CONCLUSÃO

O Biotério Central do Instituto Butantan conta com dois métodos físicos para o preparo da água ofertada aos animais. A água que vem da rede de distribuição municipal, já tratada, passa por um sistema de filtragem de 3mm e são ofertadas aos animais em gaiola polipropileno e aos animais que ficam em microisoladores, a água é autoclavada.

Concluimos que não há diferenças significativas, pois os resultados de pH, densidade e proteínas, além dos outros marcadores das tiras reagentes estão dentro dos valores aceitáveis para camundongos, e os valores negativos acabam não tendo significância analítica, então podemos concluir que os dois métodos são eficientes porém, em racks fechados a água autoclavada podem garantir um padrão de esterilidade mais segura, pois além da autoclavação, não há contato com meio externo, além da água, a ração autoclavada e principalmente os animais, já que estão isolados do meio externo, assim garantindo todos os padrões para que esses animais sejam usados tanto na alimentação de outros animais, como ser usados como modelo experimental.

REFERÊNCIAS¹

ACHIMARAN, S.; ARCHUNAM, G. Proteínas urinárias e comunicação feromonal em mamíferos. **Jornal Indiano de Biologia Experimental**. v. 40, n. 9, p. 1077-8, 2002.

ANDRADE OV; CRUZ N. A; IRARA, N.O; **O exame de urina e a importância de sua interpretação**. In: Documento científico do departamento de nefrologia da Sociedade de Pediatria de São Paulo. Disponível em: <https://www.spsp.org.br/PDF/SPSP-DC%20Nefro-Exame%20de%20urina-07.10.2020.pdf> . Acesso em: 07 out. 2020

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 388, 2002.

BEARSS, J. J.; HONNOLD, S. P.; PICADO E. S.; DAVIS, N. M.; LACKEMEYER, J. R. Validation and verification of steam sterilization procedures for the decontamination of biological waste in a Biocontainment Laboratory. **Applied Biosafety Journal – ABSA International**. v. 22, n. 1, p. 33-37, 2017.

COELHO, A. C . **Fatores determinantes de qualidade de vida física e mental em pacientes com doença pulmonar intersticial: uma análise multifatorial. 2009**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/16359/000695147.pdf?sequence=1> . Acesso em: 4 set. 2009.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Resolução Normativa CONCEA nº 33, de 18.11.2016. **Procedimentos Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica**. p. 8, 2016. Acesso em: 30 nov. 2022.

EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES . **European Confederation of Laboratory and Medicine** - European Urinalysis Group. Scand J Clin Lab Invest2. 000; 60:1-96 Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/246167552_European_Urinalysis_Guidelines

HIREN, P.; PATEL, M. D. The Abnormal Urinalysis. **Pediatra Clin N Am**. v. 53, p. 325-337, 2006.

JOHNSON, R. J.; FEEHALLY, J.; FLOEGE, J. **Nefrologia clínica: abordagem abrangente**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

KAMEL, K. S.; CHEEMA-DHADLI, S.; HALPERIN, M. L. Studies on the pathophysiology of the low urine pH in patients with uric acid stones. **Kidney Int**. v. 61, n.3, p. 988-994, 2002.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação de documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego (EUA): Elsevier, p. 485-528, 2008.

KURTZ, D. M.; FEENEY, W. P. The Influence of Feed and Drinking Water on Terrestrial Animal Research and Study Replicability. **ILAR J.** v. 60, n. 2, p. 175-196, 2020.

OLIVEIRA, G. **O uso de camundongos da linhagem Swiss Webster: descrição das principais características do modelo animal**. 1. ed. Rio de Janeiro: PoloBooks, 2017.

POP - ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS (IB/POP/BIC/GER/GER-0016).

POP - PREPARO DE GAIOLAS E BEBEDOUROS PARA CRIAÇÃO DE ANIMAIS - (IB/POP/BIC/CDA/GER-0003)

SA, L. L. C.; JESUS, I. M.; SANTOS, E. C. O., VALE, E. R.; LOUREIRO, E. C. B; AS, E., V. Microbiological quality of drinking water in two areas following sanitation interventions - Belém, Pará State, Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 14, n. 3, p. 171-180, 2005.

SILVA, J. M. P; VASCONCELOS, M. M. A; DIAS, C. S; VASCONCELOS, M. A; MENDONÇA, A. C. Q; FROES, B.; OLIVEIRA, E. A. Aspectos atuais no diagnóstico e abordagem da infecção do trato urinário. **Rev Med Minas Gerais**. v. 24, p. 20-30, 2014.

SPLABOR – Equipamentos para laboratório. *In: O que é uma autoclave? Quais seguimentos precisam utiliza-la*. 14 dez. 2017. Disponível em: <https://www.splabor.com.br/blog/autoclaves/aprendendo-mais-autoclave-sua-historia-e-quais-segmentos-precisam-utiliza-la/>. Acesso em: 18 out. 2022.

STRASINGER, SK. **Uroanálise e Fluidos Biológicos**. 3. ed. São Paulo: Editora Premier, 1996.

WHIPPLE, B., AGAR, J., ZHAO, J., et al. As mudanças induzidas pela água potável acidificada no comportamento e na microbiota intestinal de camundongos do tipo selvagem dependem do modo de acidificação. **Relatórios científicos**. v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021.

WOLF, K. J., DAFT, J. G., TANNER, S. M., HARTMANN, R.; KHAFIPOUR, E.; Lorenz, R. G. Consumption of acidic water alters the gut microbiome and decreases the risk of diabetes in NOD mice. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 62, n. 4, p. 237-250, 2014.