UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIENCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

"Avaliação das condições ambientais em biotérios da USP"

Eliane Alves da Silva Pinho

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

RIBEIRÃO PRETO – SP
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIENCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

"Avaliação das condições ambientais em biotérios da USP"

Eliane Alves da Silva Pinho

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Profª Drª Nivea Lopes de Souza

Co-orientador: Profª Drª Elisabeth Spinelli de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO – SP
2015

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os animais utilizados em pesquisas, que em diversas circunstâncias possuem suas vidas, vontades e instintos violados em prol da ciência humana. A esses dignos seres devemos respeito, empatia e posturas éticas, que lhes proporcionem bem estar e alivio de suas dores e sofrimentos.

"Proper husbandry practices and housing should be the safeguard for the wellbeing of the mice but also a prerequisite for sound scientific methodology. Inadequacies can skew scientific findings and render particular research useless, while good husbandry minimizes variations that can modify an animal's response to experimentation." (American Association for Laboratory Animal Science - AALAS, 2008)

AGRADECIMENTOS

-À professora Drª Nivea Lopes de Souza, por aceitar ser minha orientadora e transformar em realidade esse trabalho que tanto me ensinou. Sua orientação e testemunho de seriedade foram fundamentais para a concretização deste estudo.

-À professora Drª Elisabeth Spinelli de Oliveira, pelo seu apoio, estímulo e contribuições para o desenvolvimento desse trabalho. Quero agradecer também seus ensinamentos durante as disciplinas da graduação.

-Ao meu querido marido Rodrigo (Zóim), meu companheiro incondicional. Obrigada pelo incentivo, pelas inúmeras ajudas, conselhos e, principalmente, pelo seu amor! Te amo!

-Aos meus pais Moacir e Neiva, irmã Eline, irmão Eliézer (*in memoriam*), sobrinho Thiago e cunhado Rogério. Amo muito vocês!

-À minha amiga/madrinha e admirável professora Dra. Claudia Maffei, por ter feito parte da minha formação universitária e pessoal.

-À minha querida amiga Renata (Bunny) pela sua amizade, fidelidade e coleguismo. O que seria de mim na bio sem você? Você foi minha dupla em todos os trabalhos e com você ao meu lado não tive medo dos desafios, nem da solidão... Fui muito feliz por ter te encontrado e pretendo levar sua amizade para o resto da vida. Muito obrigada!

-À minha querida amiga Paulinha pela sua amizade, companheirismo e parceria. Muito obrigada pelo auxílio com as referências bibliográficas e conselhos importantes. Te adoro!

- Ao meu amigo e veterano Murilo (Vaca) pelas contribuições, sugestões e correções. Muito obrigada!

-À 46ª turma de biologia da FFCLRP/USP, que durante a graduação, dividiram comigo as dificuldades e os prazeres da vida acadêmica.

-Aos meus amigos: Ana Carla (Passarinha); André (Maminha); César (Mineiro); Gabriel (Cid); Gustavo (Guga), Laura (Laurão), Maria Isabel (Juminha), Maria Patrícia (Paty); Paulo Henrique (PH); Sophia (Mococa/Coxa); Tábita (Socorro) e Thaisa (Bis). Obrigada pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês as pausas entre um parágrafo e outro tornaram melhores não só meus trabalhos, mas tudo o que tenho produzido na vida.

-Aos meus queridos amigos de outra espécie Duque/Drogon (meu amigo e fiel escudeiro canino), Adele e Nikita *"in memoriam"* (minhas princesas roedoras).

RESUMO

Os biotérios são instalações onde ocorrem a criação, manutenção e experimentação com animais de laboratórios. Dentre os biotérios brasileiros destacam-se alguns da região sudeste, na qual ainda há aqueles com problemas estruturais que comprometem a saúde dos animais e, consequentemente, os protocolos experimentais desenvolvidos. Por não haver dados concretos sobre os biotérios brasileiros, objetivamos investigar as condições ambientais de biotérios de experimentação da USP (*campi* Ribeirão Preto e São Paulo). Como metodologia elaboramos um questionário, que fora distribuído a trinta e quatro biotérios cadastrados na Pró-Reitoria de Pesquisa da USP e as participações ocorreram mediante a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, com compromisso de sigilo absoluto. Os resultados desse estudo foram obtidos a partir das respostas fornecidas por onze biotérios. A maioria dos biotérios analisados pertence ao padrão sanitário convencional, onde não são exigidas barreiras sanitárias específicas. Essa ausência de regras definidas, em alguns casos, pode gerar confusão na interpretação das reais condições ambientais a serem oferecidas, como observado nesse estudo. Dentre as inadequações encontradas nos biotérios analisados, destacam-se: 1- A necessidade de ampliação das instalações para criação de corredores e áreas de apoio; 2- A promoção, homogeneização e individualização das espécies, otimizando o espaço com racks ou estantes ventiladas; 3- Correção e implementação de sistemas de monitoramento da umidade relativa do ar, ventilação e exaustão e 4- Adequar as contratações de médicos veterinários, como prevê a legislação brasileira. Conclui-se, portanto, que os biotérios de animais de padrão sanitário convencional da USP, que foram analisados, apresentam sérias inadequações de instalações e de funcionamento, posicionando, alguns destes, em um patamar de qualidade inferior aos padrões nacionais previstos.

Palavras-chave: Animais de laboratório, Bem estar animal, Biotérios, Instalações.

SUMÁRIO

1. Introdução..... 1
1.1.Modelos de animais..... 4
1.2.Classificação de animais quanto ao padrão sanitário ou padrão ecológico..... 5
1.3.Instalações e barreiras sanitárias..... 7
1.4.Desinfecção e esterilização..... 13
1.4.1.Métodos físicos de esterilização..... 14
1.4.2.Métodos químicos de desinfecção e esterilização..... 15
1.5.Biossegurança em Biotérios..... 18
1.6.Caracterização ambiental 20
1.7.Alojamentos 21
1.8.Filtros de ar..... 25
1.9.Cama 25
1.10.Temperatura e umidade 26
1.11.Ventilação, Exaustão e Qualidade do Ar 27
1.12.Luminosidade 29
1.13. Ruídos..... 30
1.14. Alimentação e Água..... 31
1.15. Enriquecimento ambiental e bem-estar animal..... 32
2. Biotérios da USP..... 36
3. Materiais e métodos..... 37
4. Resultados e Discussões..... 37
4.1. Status sanitário ou ecológico dos biotérios analisados..... 38
4.2. Divisão de áreas do biotério..... 40
4.3. Barreiras Sanitárias..... 42
4.3.1. Desinfecção e esterilização..... 45
4.3.2. Equipamentos de Proteção Individual (EPI)..... 47
4.3.3. Alojamentos..... 48
4.3.4. Corredores..... 51
4.3.5. Climatização..... 53
4.3.6. Material de cama e periodicidade de troca das gaiolas..... 57
4.4.Fotoperíodo..... 59
4.5.Enriquecimento Ambiental 60

4.6.Presença do veterinário como responsável técnico..... 63
5. Conclusão..... 64
6. Referências bibliográficas:..... 67
7. Anexo1 – Questionário..... 76

1. Introdução

Vários autores discorrem sobre o fato de que as práticas que envolvem o uso de animais em observações experimentais datam desde a antiguidade. Graças a tais ocorrências o homem pode adquirir conhecimentos de biologia em geral, de saúde, comportamento e das interações "homem-animal-ambiente" (PAIVA *et al.*, 2005).

Para que esta prática se torne moralmente aceita e com resultados confiáveis, é imprescindível ter-se consciência de que o animal, como ser vivo, apresenta hábitos de vida próprios, apresenta memória, preserva o instinto de sobrevivência e é sensível a angustia e à dor (PAIVA *et al.*, 2005). Deste modo, é de extrema importância que se mantenham posturas éticas durante todas as fases do desenvolvimento das pesquisas.

Um ponto relevante sobre a utilização de animais em experimentos foi bem descrito pelo filósofo Jeremy Bentham em 1789, que questionou, não o fato destes animais serem racionais ou mesmo pensarem, e sim, a possibilidade deles sofrerem. Portanto, cabe aos pesquisadores a consciência de que são responsáveis pela preservação do bem-estar dos animais. Em função disto, devem conhecer muito bem a etologia e a biologia da espécie com a qual se está trabalhando (MAJEROWICZ, 2005; RIVERA, 2006).

Animais destinados a experimentos devem ser encarados como reagentes biológicos, onde todos os fatores que estão no seu entorno poderão influenciar sua resposta, e consequentemente os resultados do experimento. Também deve-se considerar que a manutenção dos animais destinados à pesquisa sob condições ambientais estáveis assegura confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados a serem obtidos (MAJEROWICZ, 2005).

Cabe aos cientistas antes de iniciar qualquer experimento calcular meios e fins, respondendo de forma sincera e racional os seguintes questionamentos: Este experimento é necessário? É relevante? Não será o experimento uma repetição desnecessária? "*How much gain for how much pain*?" (RIVERA, 2006).

Com a finalidade de conscientizar e tornar humanizadas as pesquisas realizadas com animais, o zoologista William M.S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch publicaram uma obra que traz diretrizes éticas, por meio de três princípios, os chamados 3R's (RUSSEL e BURCH, 1959), quais sejam:

- *Replacement:* refere-se à adoção de métodos que permitam substituir o uso de animais em ensino e pesquisa;

- *Refinement*: é relativo à necessidade de melhorias nos manejo, habitação, cuidados e procedimentos, visando à minimização real do desconforto ou do potencial de dor, sofrimento, angústia, dano duradouro e/ou melhorias no bem-estar em situações em que o uso de animais é inevitável;
- *Reduction*: afirma como imprescindível a busca de métodos que minimizem o número de animais a serem utilizados. Esta redução deve permitir ao pesquisador obter níveis comparáveis de informações a partir de números reduzidos de indivíduos, ou então, obter mais informações a partir do mesmo número de animais.

A partir desta obra todas as legislações, inclusive a brasileira, passaram a considerá-la como item indispensável para o trabalho de comissões de ética no uso de animais. No Brasil, tais instâncias, as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs), só passaram a ser obrigatórias em instituições de ensino e/ou pesquisa, em que se trabalha com animais, a partir da Lei Federal nº 11.794 de 2008, conhecida como Lei Arouca.

A Lei nº 11.794 decorreu de uma longa tramitação de 15 anos no Congresso Nacional e resultou da demanda de pesquisadores preocupados com tamanha lacuna jurídica. Desta forma, também foi possível arrefecer a discussão entre entidades de proteção animal e pesquisadores, pois os trabalhos de investigação científica passaram a ser melhor norteados. Nossos centros de pesquisas passaram a ser influenciados no sentido de seguirem normas coerentes e humanísticas durante todas as etapas de criação e de experimentação com animais. Os membros desta comissão possuem a responsabilidade de avaliar a utilização de animais em experimento, conciliando os aspectos éticos com os interesses científicos, legais, econômicos e comerciais (SCHNAIDER; SOUZA, 2003, BRASIL, 2009).

Deve-se considerar que a Lei Arouca também estabeleceu a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) como um órgão integrante do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) (Regulamentada pelo Decreto n° 6.899 de 2009), que passou a ser o responsável por todas as discussões referentes à criação e uso de animais para propósitos científicos e didáticos no Brasil (CONCEA, 2009).

Várias instituições de ensino superior brasileiras já tinham suas respectivas CEUAs e os pesquisadores e biotérios passaram a ter melhor orientação no sentido de incrementar a boas condições para criação e experimentação com animais.

Os biotérios, instalações onde ocorrem a criação, manutenção e experimentação com animais de laboratórios, geralmente são pertencentes a instituições de ensino e/ou pesquisa. No sentido de zelar, regularizar e fiscalizar o uso ético de animais, os biotérios só podem atuar sob a resolução normativa RN nº 3 do CONCEA, de 14 de dezembro de 2011, a qual torna obrigatório que sejam implantados programas de gestão consistente, garantindo instalações adequadas, suprimento de insumos, manutenção da biossegurança, qualidade do macro e microambientes, integridade das barreiras sanitárias, garantia do bem-estar animal entre outras providências (BRASIL, 2009; BRASIL, 2011; MORONI; LOEBEL, 2014).

Dentre as dificuldades de se estabelecer a padronização de biotérios no Brasil está o fato destes estarem predominantemente vinculados ao setor público, o que dificulta o desenvolvimento de programas de investimentos a longo prazo, concorrendo para uma defasagem tecnológica em relação aos biotérios de países do primeiro mundo. A falta de recursos e investimentos no setor faz com que muitos pesquisadores utilizem modelos animais não padronizados ou, até mesmo, inadequados, além do descumprimento de normas éticas voltadas aos animais, ferindo as leis de universalidade e reprodutibilidade dos experimentos. Como consequência desta realidade, observa-se frequentemente a recusa de trabalhos enviados para publicação em periódicos internacionais (COBEA, 2003).

Dentre os biotérios brasileiros destacam-se alguns da região sudeste, na qual ainda há aqueles com problemas estruturais que comprometem a saúde dos animais e, consequentemente, os protocolos experimentais desenvolvidos. Subestimar estas consequências pode significar uma condenação à comunidade científica atual e futura a um grave isolamento científico, com um importante descompasso entre o que se faz nos países desenvolvidos e o que se pode fazer no Brasil (CGEE, 2003).

1.1. Modelos de animais

Os animais produzidos e utilizados para fins experimentais devem possuir características genéticas e sanitárias adequadas, visando assegurar padrões pré-estabelecidos internacionalmente. A uniformidade dos animais, decorrente de variáveis ambientais, genéticas e experimentais, é responsável pela diminuição da quantidade amostral mínima de indivíduos utilizados e pela reprodutibilidade dos resultados, respeitando assim, os princípios éticos de experimentação e adoção de normas e protocolos universais (POLITI *et al*, 2008).

Com relação às características genéticas dos modelos animais, sua classificação está baseada em programas de direcionamento de acasalamentos do plantel, os quais definem a forma de transmissão das características genéticas. Sendo classificados em dois grandes grupos: heterogênicos (não-consangüíneos ou *outbred*) e isogênicos (consangüíneos ou *inbred*), sendo que, aos *inbred*, também foram acrescentados os híbridos, os mutantes e os animais 'engenheirados' (BAHIA, 2001; SANTOS, 2002; FERREIRA *et al*, 2005; POLITI *et al*, 2008).

- Heterogênicos – As linhagens *outbred* são caracterizadas como linhagens geneticamente heterozigotas para muitos dos pares alélicos, sendo mantidas em sistema de cruzamentos rotacionais direcionados (NOMURA; YONEZAWA, 1996). Experimentos com estes animais são de grande importância, pois apresentam grande variabilidade genética, assim como ocorre com a espécie humana. Alguns exemplos são: camundongos (*Mus musculus)* Swiss Webster, ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar e hamsters Sírios (*Mesocricetus auratus*).
- Isogênicos - As linhagens isogênicas são obtidas por meio de acasalamentos entre irmãos por 20 gerações, após os quais serão homozigotos para quase todos os pares alélicos. Para que linhagens distintas sejam consideradas isogênicas é necessário um percentual mínimo de 98,6% de homozigose entre pares de genes alélicos. Tais linhagens permitem a criação de populações de animais geneticamente homogêneas. A ausência de variáveis genéticas inter-animais torna menor o número amostral mínimo para um experimento, coexistindo apenas as variáveis ambientais e as experimentais. Alguns exemplos são: camundongos BALB/c, C3H/HeJ e C57Bl/6J; ratos Wistar-Han e Long Evans.

- Híbridos - São animais provenientes do acasalamento entre duas linhagens isogênicas. O objetivo deste cruzamento se baseia na obtenção de animais heterozigotos para determinado par de alelos, o qual se deseja estudar. Para isso utilizam-se duas linhagens que sabidamente possuem alelos diferentes para o gene em questão.
- Mutantes espontâneos - As linhagens isogênicas podem manter suas similaridades gênicas indefinidamente, desde que a regra de acasalamento entre irmãos sejam seguidas. Porém, existe a possibilidade de ocorrerem mutações espontâneas ao longo do genoma. Nesse caso, procura-se trazer essa mutação para uma linhagem consanguínea, a fim de comparar os efeitos do alelo mutante sem a interferência de outras combinações gênicas.
- Animais 'engenheirados'– são aqueles que apresentam mutações induzidas por meio de manipulação *in vitro* de DNA, podendo se construir DNA transgênico e mutações pontuais (*knockouts*). Os Animais transgênicos transportam um segmento do DNA exógeno que foi incorporado no seu genoma através da recombinação não-homóloga. Os camundongos com mutações pontuais (*knockouts*) são criados por perturbações genéticas, substituições, ou duplicações nas células tronco-embrionárias através da recombinação homóloga entre o DNA exógeno e o DNA endógeno.

1.2. Classificação de animais quanto ao padrão sanitário ou padrão ecológico

Padrão sanitário ou ecológico é resultante da relação dos animais com microrganismos associados, ou seja, com as microbiotas interna e externa. A padronização sanitária está diretamente relacionada à eficiência das barreiras sanitárias adotadas no biotério, as quais visam evitar contaminantes (FERREIRA *et al*, 2005).

Os animais de laboratório podem ser classificados de acordo com seu padrão sanitário como: *Germ Free* (GF) ou livres de germes ou axênicos, gnotobióticos ou de flora definida, *Specific Pathogen Free* (SPF), SOPF e convencionais ou sanitariamente indefinidos (ALVES *et al* 2002). A figura 1 apresenta um esquema da organização dos animais de acordo com o padrão sanitário:

- *Germ Free* (GF) são animais não colonizados por quaisquer microrganismos, nem ao menos pelos comensais. Devem ser, necessariamente, criados e mantidos em isoladores, que se traduzem como equipamentos de barreiras sanitárias rigorosas e permitem controle ambiental total.
- Gnotobiótico (do Grego *gnotos* = conhecer + *biota* = vida) é a denominação utilizada para elucidar a categoria sanitária de animais que apresentam microbiota colonizadora definida, associada intencionalmente pelo pesquisador. Devem ser, necessariamente, criados em sistema sanitário rigoroso, ou seja, em isoladores. São intencionalmente contaminados com os microrganismos que o pesquisador deseja investigar. O prefixo se refere à quantidade de espécies microrganismos inoculados no animal, pelo pesquisador (um > mono, dois > di, três > tri, etc.), ou seja, monoxênico é o animal inoculado com apenas uma espécie de microrganismo, dixênico corresponde ao animal inoculado, intencionalmente, com duas espécies de microrganismos e polixênico é o animal inoculado com várias espécies de microrganismos.
- *Specific Pathogen Free* (SPF) ou Livre de Patógenos Específicos ou heteroxênicos são animais livres de microrganismos patogênicos específicos, porém não necessariamente livres de outros germes. São necessariamente livres de agentes capazes de lhes causar doenças. Atualmente tem-se incorporado o conceito de animais SOPF, animais livres de agentes patogênicos e de oportunistas especificados. Animais que não possuem anticorpos virais, sorologicamente demonstráveis, são definidos como *Vírus Antobody Free* (VAF).
- Convencionais: do ponto de vista sanitário são animais mantidos em ambientes desprovidos ou com poucas barreiras sanitárias, o que possibilita que eles carreiem microbiota indefinida. Geralmente são mantidos em gaiolas e estantes abertas (Figura 1).

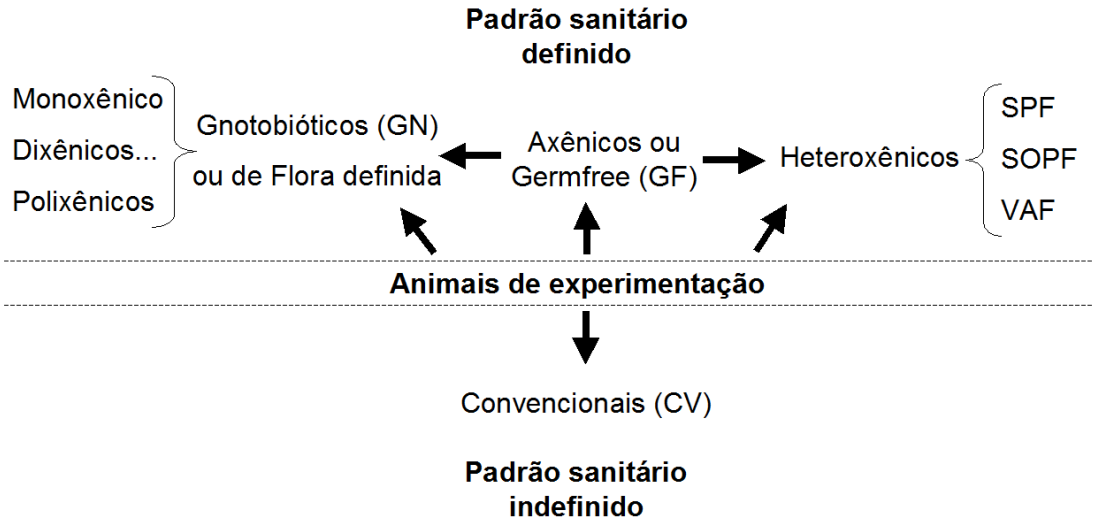


Figura 1 – Classificação dos animais de laboratório segundo seu padrão sanitário.

1.3. Instalações e barreiras sanitárias

Biotérios devem atender e se adequar aos padrões de criação e manutenção de cada espécie de laboratório, bem como possuir programas de gerenciamento das condições físicas e ambientais, a fim de garantir seu desenvolvimento e reprodução, mantendo sua sanidade e bem-estar, minimizando variações indesejáveis nos resultados dos ensaios (MEMARZADEH, 1998).

De acordo com Hessler e Leary (2002), funcionalmente os biotérios são divididos em áreas para alojamento dos animais e áreas de apoio. As áreas de alojamento referem-se às salas de alojamento convencional, sala de quarentena; barreiras sanitárias para contenção de agentes infecciosos; contenção de agentes de risco químico e radioisótopos. Necessariamente, as espécies devem ser mantidas individualizadas. As áreas de apoio incluem as salas de administração, treinamento e reuniões; área para pessoal administrativo e técnico, sala para equipamentos e suprimentos de escritório, biblioteca e sala de material para treinamento, sala de necropsia, laboratório de diagnóstico, sala de equipamentos para diagnóstico por imagem como aqueles que possibilitam os exames de raios-x e ultrassom e anfiteatro.

De acordo com Couto (2002c), as instalações de um biotério devem ser projetadas de forma a atender adequadamente às recomendações para a criação e/ou manutenção de animais. O local deve ser construído distante de fontes poluidoras inalatórias, auditivas, entre outras, e que permita futuras ampliações, objetivando

melhorias. Abaixo são descritos percentuais gerais de distribuição das áreas pertencentes ao biotério:

- 46% para sala de animais e quarentena;
- 14% para circulação (corredores);
- 14% para depósitos (alimentos, materiais e insumos);
- 11% para higienização e esterilização;
- 8 % para laboratório;
- 7% para administração.

De acordo com Cardoso (2001) e Politi *et al.* (2008), as áreas físicas de um biotério podem ser edificadas de duas formas principais: pavilhonar ou em bloco único. No sistema pavilhonar deve existir uma separação espacial entre o alojamento dos animais e as outras dependências de apoio (áreas de controle de serviços), que devem ser posicionadas de modo central, favorecendo o fluxo operacional (Figura 2). Essa disposição permite uma separação eficiente dos animais, de acordo com a espécie e/ou categoria sanitária. As áreas destinadas aos animais devem conter equipamentos mecânicos, depósitos de ração e demais suprimentos. As áreas de apoio seriam as de recepção, escritório e salas de equipamento para lavagem e desinfecção e esterilização. Como desvantagens desse tipo de edificações estão a necessidade de grandes áreas e o elevado custo devido às suas construção e manutenção.

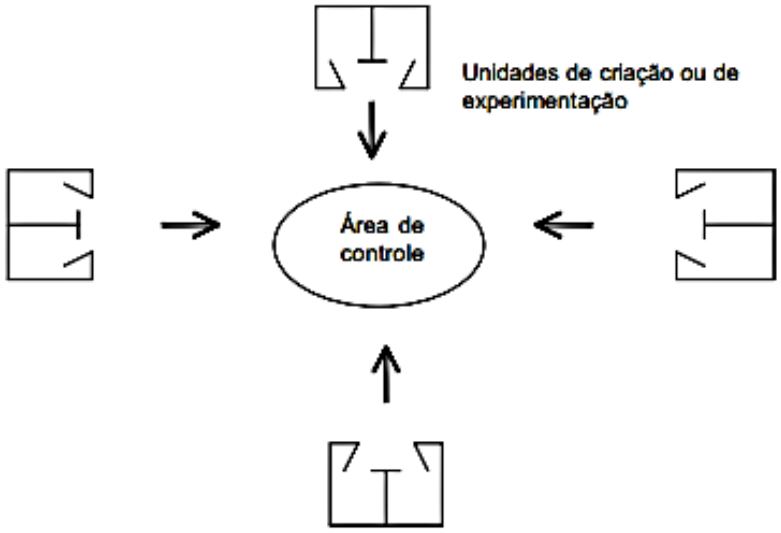


Figura 2 – Sistema pavilhonar de edificação de biotérios (CARDOSO, 2001).

O sistema de construção em bloco único mantém todas as dependências próximas, em uma única edificação, porém separadas por meio de barreiras físicas, como paredes. Existe a possibilidade desse ambiente ser construído com um único corredor, mas esse formato apresenta desvantagens por haver fluxo bidirecional de técnicos e materiais, compartilhando entrada e saída de inúmeros ítens limpos e sujos, ocasionando contaminações (Figura 3a). Por outro lado, pode apresentar dois acessos separados, um denominado corredor limpo ou de acesso às salas de animais, destinado à passagem de material limpo e de pessoas devidamente autorizadas e portando EPIs. O outro, onde está o corredor sujo, para retirada de gaiolas e bebedouros sujos, de animais de descarte ou mortos, e de saída de materiais sujos ou contaminados (Figura 3b).

Para assegurar que os biotérios no Brasil tenham características estruturais e funcionais que limitem as variações fisiológicas que possam interferir na saúde e bem estar dos animais, a Resolução Normativa nº15 do CONCEA de dezembro de 2013, em complemento ao art. 5º da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, entrou em vigor direcionando e normatizando a Estrutura Física e Ambiental de Roedores e Lagomorfos no Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica.

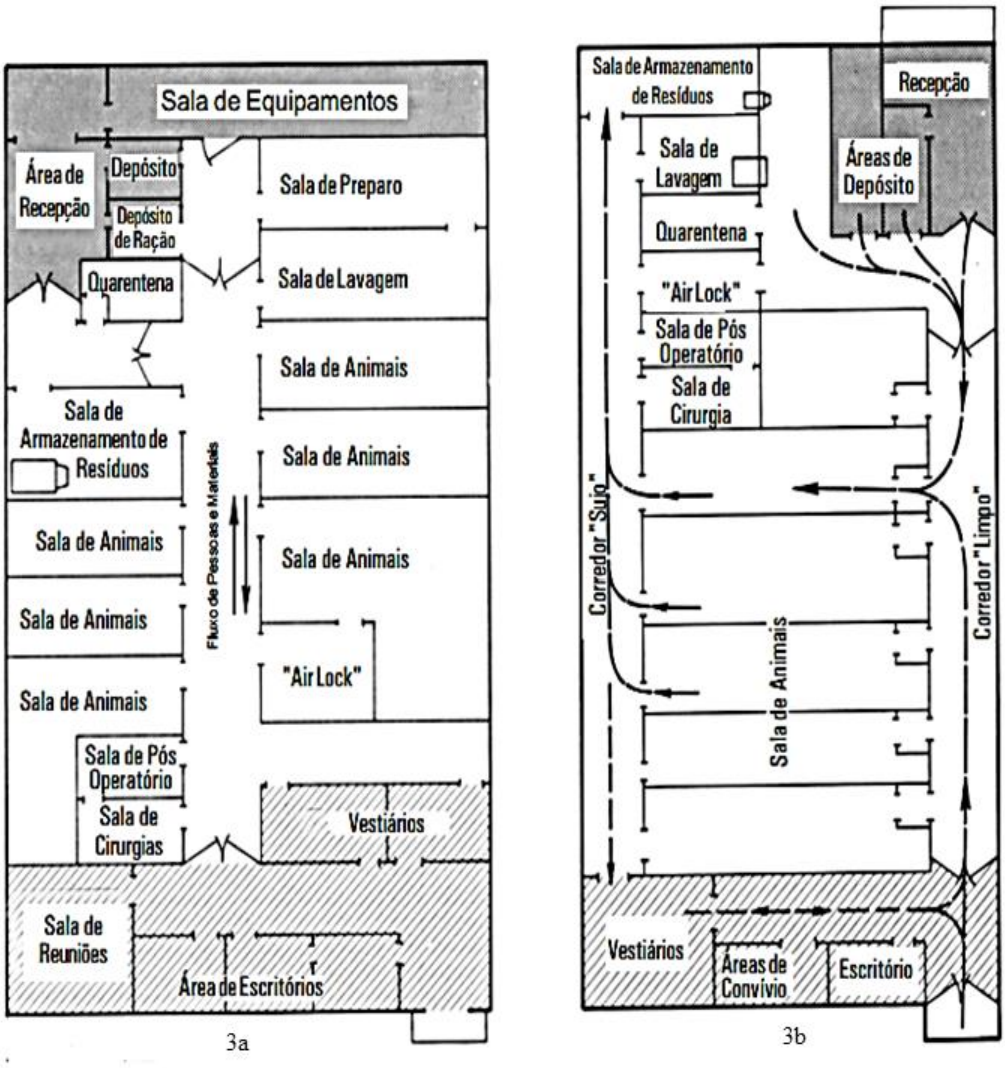


Figura 3- Sistema de construção de biotérios em bloco único. 3a) biotério com corredor único. 3b) biotério com dois corredores específicos para entrada de materiais limpos e saída de resíduos contaminados (CARDOSO, 2001)

De acordo com a mesma resolução, a arquitetura e escolha de materiais apropriados para edificação de biotérios são de extrema importância para propiciar adequadas condições de funcionamento e higienização (CARDOSO, 2001; ANDRADE *et al.*, 2002; CONCEA, 2013).

As paredes devem ser lisas, não absorventes e resistentes à umidade e ao impacto. Não podem desenvolver rachaduras ou fissuras com facilidade. As juntas entre as paredes, pisos e teto devem ser arredondadas. Os materiais empregados nas superfícies e paredes devem ser impermeáveis e permitir a limpeza e desinfecção com detergentes e desinfetantes e resistir à água sob pressão.

O teto deve ser resistente a frequentes lavagens e desinfecções, embora esteja menos sujeito ao desgaste. Tetos de concreto são os mais indicados por serem lisos e aceitarem pinturas. Nos casos em que forem utilizados tetos falsos, os mesmos devem ser fabricados em material impermeável, ter superfície lavável, ser lisos e livres de rachaduras e as placas deverão ser fixadas e as juntas vedadas.

O piso deve ser resistente aos produtos empregados na rotina de higienização e desinfecção, bem como ao emprego de máquinas de lavar com jato pressurizado. Deve ter material não absorvente e resistir a impactos. O material empregado deve oferecer facilidade de reparo, suportar o peso e movimento dos equipamentos do biotério, de maneira que não ocorram fissuras, trincas ou rachaduras e corrosão.

Não pode haver janelas em salas de animais, pois a variação da luminosidade externa pode interferir diretamente na fisiologia animal, já que nem todas as espécies aceitam bem a luz solar. Além disso, o aquecimento ambiental das salas de animais pode elevar os gastos da instituição por ter que manter um sistema de refrigeração do ar mais potente. Para as funções de monitorização devem ser instalados visores equipados com dupla armação de vidro entre as salas dos animais e corredores.

As portas devem ser confeccionadas de modo a não terem frestas e, quando necessário, ser vedadas para evitar o acúmulo de sujidades, agentes infectantes e abrigo de insetos. O material ideal deve apresentar resistência, impermeabilidade e durabilidade. Os batentes devem ser embutidos na porta e não sobrepostos, a fim de evitar bordas e acúmulo de particulados, como poeiras. A porta deve apresentar, de preferência, dispositivo de abertura sem a utilização das mãos, além de possuir uma abertura compatível com a circulação de pessoas, materiais e carrinhos.

A rede elétrica deve ser dimensionada, previamente, de modo a permitir um número apropriado de lâmpadas e tomadas, sendo estas adequadas aos diferentes tipos de equipamentos que serão instalados. Deve ser prevista a instalação de um grupo gerador dimensionado para manter o biotério em funcionamento, no caso de falha no fornecimento de energia. Luminárias, interruptores, tomadas e outros elementos das salas dos animais deverão ser embutidos e vedados para impedir sujidades, microrganismos e abrigo de insetos. Também deve ser previsto um sistema de fotoperíodo regulável, de forma a oferecer um ciclo de luz uniforme.

As barreiras sanitárias são importantes para evitar microrganismos potencialmente infecciosos nos locais de criação ou experimentação animal, além de prevenir seu escape para o exterior (ANDRADE-SILVA *et al*, 2012). As barreiras se baseiam em um conjunto de medidas de contenção física e química de instalações e materiais, e proteção pessoal, (CARDOSO, 2001; LAINETTI, 2009). Dentre elas podemos destacar:

- Tanque de passagem – é um local onde os materiais termolábeis são conduzidos à esterilização por meio de imersão em solução esterilizante. Trata-se de uma barreira química entre as áreas séptica e asséptica (figura 4).
- Pass through – sistema de passagem de produtos entre dois ambientes diferentes. O sistema é composto por duas portas com intertravamento, que visa impedir a troca de ar, risco de contaminação cruzada e ainda limita a movimentação de pessoas nos diferentes ambientes.
- Air-lock – mantém o ambiente pressurizado (pressão positiva ou negativa), com a finalidade de impedir a passagem do ar de um ambiente para o outro, evitando assim contaminações.
- Cabine para troca de gaiolas (ou estação de troca) – tem por objetivo evitar a contaminação dos animais durante as trocas de gaiolas. Também se presta a conter aerossóis gerados em ensaios com os animais (manuseio de fluidos ou tecidos, ovos de animais infectados, necropsia de animais infectados).
- Isoladores – equipamentos projetados para manter os animais, seguramente, totalmente livres de contaminações, garantindo a manutenção do padrão sanitário e genético das linhagens, atuando como repositório. Geralmente é constituído de filme plástico de polivinil clorido (PVC). Em uma de suas faces há luvas para manipulação dos animais e materiais no interior do isolador e em outra face há o porto de passagem para entrada e saída de animais, insumos e materiais.

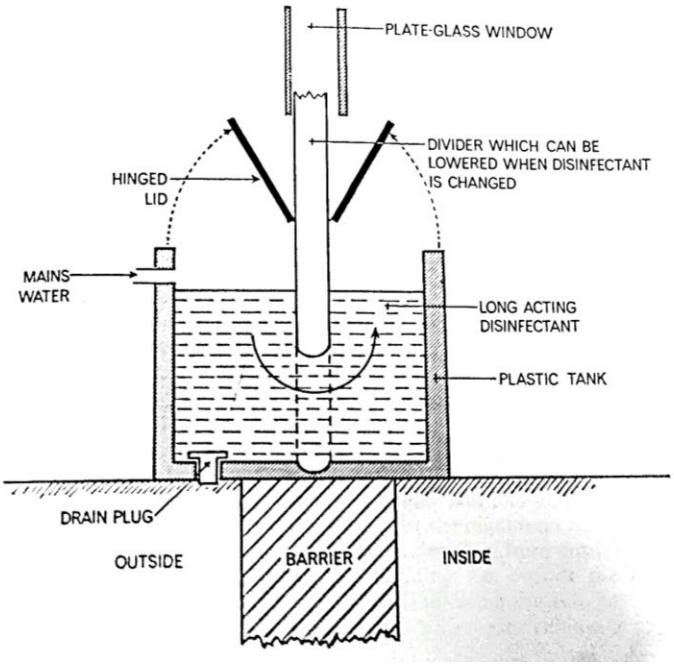


Figura 4 – Esquema de funcionamento do tanque de passagem, onde materiais são imersos em soluções desinfetantes e conduzido de um lado a outro da barreira química (BLEBY, 1976).

Todo trabalho conduzido com animais de laboratório deve ser feito com o uso obrigatório de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs). Tal cuidado tem como objetivo reduzir ou eliminar os riscos de exposição a agentes infecciosos e substâncias químicas irritantes e tóxicas, objetos perfurocortantes, mordeduras de animais, materiais submetidos a aquecimento ou congelamento, entre outros. De acordo com Molinaro *et al.* (2009) os principais EPIs são jaleco, luvas, óculos de proteção ou protetor facial, máscara cirúrgica, gorro, propé.

1.4. Desinfecção e esterilização

Há diferentes métodos de descontaminação e esterilização, cujo objetivo é a remoção, inibição ou morte dos microrganismos por agentes físicos ou químicos. Os principais métodos de descontaminação são:

- Antissepsia - desinfecção alcançada pela utilização de substâncias químicas (antissépticas), que visam destruir ou inibir microrganismos em tecidos vivos;
- Assepsia – medidas ou técnicas que impedem a contaminação de uma determinada área ou objeto estéril;

- Desinfecção – destruição de microrganismos existentes em superfícies inanimadas;
- Esterilização - processo químico ou físico capaz de eliminar todas as formas viáveis de microrganismos, esporos e partículas virais de insumos e materiais (MORIYA; MÓDENA, 2008) (figura 5).

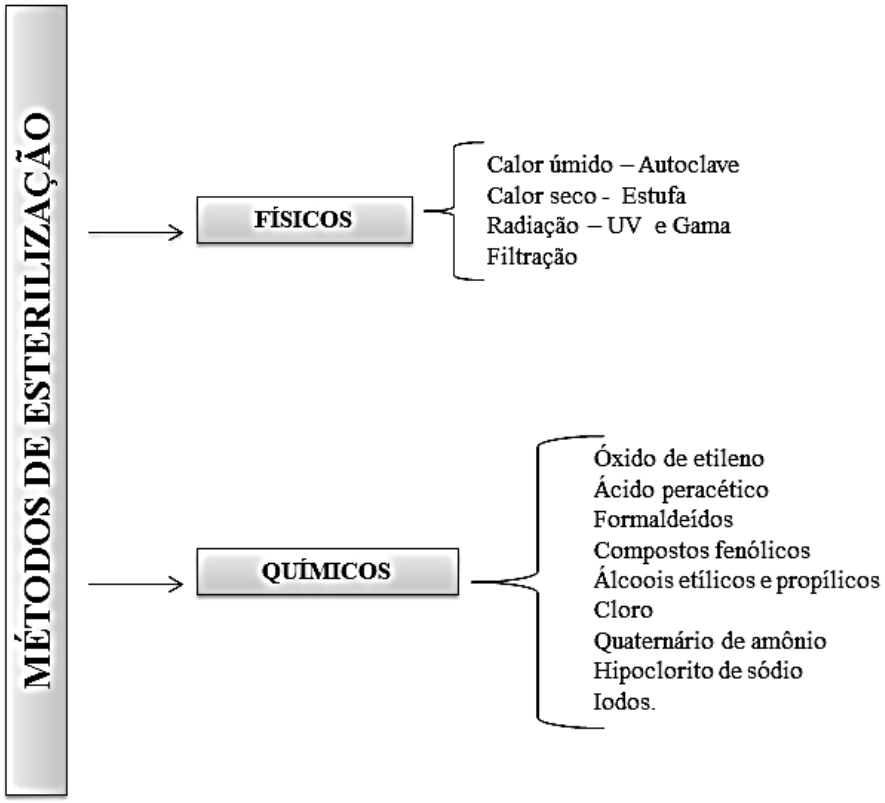


Figura 5- Esquema ilustrando alguns métodos físicos e químicos de esterilização (adaptado de D'AQUINO, 1995; CASANOVA, 2013).

1.4.1. Métodos físicos de esterilização

Os principais métodos físicos de esterilização são calor úmido, radiação e filtração (DE LUCA 1996; BRASIL, 2001; CARDOSO, 2001; COUTO, 2002a; MORIYA; MÓDENA, 2008; LAINETTI, 2009; CONCEA, 2013).

- Calor úmido - Destrói microrganismos por coagulação e denaturação irreversíveis de suas enzimas e proteínas estruturais. A autoclave é o principal equipamento de esterilização por calor úmido e sua ação está baseada na combinação de elevada temperatura (121ºC) e pressão de vapor (750 mmHg).

- Calor seco - É promovido por estufas e, em comparação com a autoclave, essa modalidade apresenta desvantagem, pois o calor sem pressão confere menor poder de penetração. O tempo mínimo para esterilização é de 60 minutos a 180 ºC.
- Radiações - Radiações não ionizantes: a radiação ultra-violeta é um exemplo, e é comumente empregada para esterilização do ar, superfícies e/ou em air locks. Radiação ionizante emite alta energia proveniente dos isótopos radioativos, tais como o Cobalto 60 (Co60 > raios gama) ou produzidos da aceleração mecânica dos elétrons com uma alta velocidade e energia (raios beta ou catódicos). Utiliza-se a radiação gama para esterilização de todos os materiais de biotério.

1.4.2. Métodos químicos de desinfecção e esterilização

Alguns compostos químicos apresentam eficiência na desinfecção, porém é necessário que se empregue substâncias umectantes para que se obtenha uma diminuição na tensão superficial, alta penetração e ação na superfície de microrganismos. De acordo com Rutala e Weber (2008) a eficácia dos desinfetantes químicos depende de vários fatores, tais como:

- Concentração ou diluição do produto;
- Tempo de exposição ao germicida;
- Tipo e nível de contaminação microbiana;
- Natureza física do objeto (por exemplo, fendas e dobradiças)
- Presença de biofilmes;
- Temperatura e pH do processo de desinfecção;
- Presença de matéria orgânica: a retirada prévia de sujidades melhora a ação do desinfetante;
- Sensibilidade e quantidade de microrganismos presentes no material ou ambiente a ser desinfetado;
- Educação sanitária dos usuários.

Os produtos químicos de desinfecção ou esterilização devem ser utilizados com critério, para que se possa alcançar os objetivos do processo. Não se deve misturar, ou

combinar desinfetantes, pois este procedimento pode causar efeitos negativos, como a neutralização do poder desinfetante, reação química produzindo subprodutos tóxicos; e ainda, por poder incrementar a resistência de determinados microrganismos. Deve ser evitado o uso de desinfetantes tóxicos, irritantes e/ou com odores penetrantes, na presença de animais. Deve-se reduzir o uso de desinfetantes corrosivos, e empregar produtos desinfetantes de amplo espectro germicida, garantindo-se assim êxito no processo de desinfecção (MORGULIS; SPINOSA, 2005). Dentre os produtos utilizados na desinfecção de biotérios destacam-se: ácido peracético, formaldeídos, óxido de etileno, compostos fenólicos, álcoois etílicos e propílicos, cloro, quaternário de amônio, hipoclorito de sódio e iodos (MEYER, 1994; KALIL; COSTA, 1994; COUTO, 2002c; BRASIL, 2008; LENGERT, 2008; MORYIA, 2008; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

- Óxido de etileno– O óxido de etileno é um gás incolor capaz de se comportar como viruscida, esporocida, bactericida, micobactericida e fungicida. Sua ação depende dos parâmetros de concentração, temperatura, umidade relativa e tempo de exposição ao gás. Sua indicação de uso é para os artigos termolábeis. É altamente explosivo e facilmente inflamável, devendo ser utilizado em equipamentos especiais denominados autoclaves para óxido de etileno. Rações e camas não devem passar por esse procedimento, pois podem concentrar o gás, ocasionando a intoxicação dos animais.
- Ácido peracético– O ácido peracético é um desinfetante de amplo espectro, capaz de oxidar e desnaturar proteínas, alterar a permeabilidade celular de microrganismos, sendo eficiente na eliminação de esporos e vírus. Todavia, não atua sobre ovos de parasitas, podendo ter sua ação bloqueada pela presença de matéria orgânica, como por exemplo, película de gordura. Uma importante vantagem desse composto se baseia no fato de sua produção e decomposição não serem tóxicos. O manuseio desse composto deve ser feito com o auxilio de EPIs adequados, pois em estado líquido é corrosivo e inflamável e, mesmo diluído em água, permanece corrosivo. O ácido peracético é usado na esterilização de isoladores e materiais que não podem ser esterilizados por processo físico.
- Formaldeído– Composto esterilizante para ambientes externos, comumente encontrado como formalina, diluído a 37% em solução aquosa. Sua ação é

baseada na alcalinização de determinados grupos de proteínas e das purinas, possuindo propriedades bactericida, fungicida, ativas contra vírus, bacilo da tuberculose e esporos bacterianos. Sua utilização dever ser controlada e cautelosa devido ao seu potencial cancerígeno.

- Álcoois etílico e isopropílico– Apresentam eficiente ação germicida, atuando na desnaturação de proteínas e solubilização de lipídios, podendo ocasionar efeitos secundários na interferência do metabolismo e eventual lise das células, sendo ativos contra bactérias Gram positivas e negativas e vírus lipofílicos. Não se prestam à esterilização, por não apresentarem atividade contra esporos bacterianos. A concentração é um fator determinante para a obtenção da ação germicida e deve ser de 70 a 92% em peso (80 a 95% em volume a 25ºC). Evaporam rapidamente, dificultando exposição prolongada, a não ser por imersão do material a ser desinfetado.
- Cloro– O cloro é um potente germicida, por ser um forte oxidante. Pode ser utilizado para desinfetar objetos e água de abastecimento, sendo essa última utilização limitada, devido aos característicos odor e sabor desagradável do cloro, quando em grandes concentrações. Pode ser utilizado sob a forma de gás ou derivados clorados, que desprendam ácido hipocloroso (composto de ação germicida). A ação germicida do cloro se perde quando em contato com matéria orgânica, pois a mesma consome o cloro disponível.
- Hipoclorito de sódio– O hipoclorito de sódio é produzido pela reação do cloro com o hidróxido de sódio, sendo frequentemente utilizado como desinfetante em superfícies. Sua ação germicida é baseada na inibição de algumas reações enzimáticas-chave dentro das células por desnaturação de proteína e por inativação do ácido nucléico. São ativos contra o bacilo da tuberculose, vírus e fungos. Dentre as vantagens, destacam-se a ação rápida e o baixo custo, pois é eficiente na diluição aquosa a apenas 0,9%. Por outro lado, apresenta ação corrosiva sobre metais e inatividade na presença de matéria orgânica (PINHEIRO *et al*, 1992).
- Quaternário de amônio– Os compostos quaternários de amônio são agentes com baixa atividade germicida e são inativados por matéria orgânica. Sua ação é baseada no aumento da permeabilidade da membrana celular como consequência da desnaturação de proteínas desse sítio. Atua como agente

fungicida, bactericida e viruscida lipofílico. Todavia, não é esporocida, tuberculocida nem age contra vírus hidrofílicos (BCCDC, 2003). Recomenda-se para uso em tanque de imersão numa diluição de 1%. Há resistência ao seu uso por parte dos Serviços de Controle de Infecção devido a relatos de contaminação das soluções e há contra-indicação pelo *Center for Disease Control* (EUA) face a ocorrência de surtos relacionados a seu uso como anti-séptico.

- Iodos– o iodo é um desinfetante germicida de nível médio, capaz de penetrar na parede celular bacteriana destruindo suas estruturas proteicas. É solúvel no álcool, e proporciona efetiva ação contra as bactérias existentes na pele íntegra. Entre os halogêneos, o iodo sob a forma de tintura (2% a 5%) é um dos anti-sépticos mais utilizados. Tinturas simples de iodo (dissolvida em álcool) tem capacidade limitada de limpeza. Estes compostos são bactericidas, esporicida, virucida e fungicida, mas requerem um tempo prolongado de contato. A capacidade desinfetante do iodo, como o cloro, é neutralizada na presença de matéria orgânica, portanto, aplicações frequentes são necessárias para desinfecção minuciosa. Tintura de iodo pode ser muito irritante para os tecidos, podendo mancha-los e ser corrosivo. O iodo "atenuado" como em escovas cirúrgicas e antissépticos cirúrgicos geralmente não irritam os tecidos. Além da sua utilização como um antisséptico, os iodóforos têm sido utilizados para a desinfecção de frascos de cultura de sangue e equipamentos médicos (BCCDC, 2003).

1.5. Biossegurança em Biotérios

O conceito de biossegurança engloba todas as ações direcionadas para a prevenção ou eliminação de riscos inerentes às atividades realizadas, que podem afetar ou comprometer a saúde de pessoas, animais e meio ambiente. Biotérios necessitam estratégias de biossegurança para garantir condições adequadas aos animais e segurança ocupacional a funcionários e pesquisadores. As instalações de um biotério são baseadas em um tipo especial de laboratório e devem seguir princípios norteadores de acordo com os níveis de biossegurança, que levará em conta instalações laboratoriais, práticas e requisitos operacionais de acordo com trabalho desenvolvido e a presença de agentes infecciosos (MOLINARO *et al*, 2009).

Os níveis de biossegurança são baseados em recomendações mínimas que devem ser seguidas de acordo com as atividades desenvolvidas nos biotérios. A tabela 1 apresenta quatro níveis de biossegurança, de NB1 a NB4, que procuram descrever as dependências dos animais e as práticas aplicáveis para o trabalho com animais infectados por microrganismos (ANDRADE *et al.*, 2002; BMBL, 2009).

Tabela 1 – Níveis de biossegurança recomendados no uso de animais infectados

NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA	PRÁTICAS E TÉCNICAS	EQUIPAMENTOS DE SEGURANÇA	INSTALAÇÕES
Nível 1 Baixo risco – não causa doença ao homem ou ao animal.	Manejo-padrão para colônias convencionais	----------	Básicas
Nível 2 Moderado risco individual e comunitário – causa doença ao homem ou ao animal	Uso obrigatório de jaleco e luvas; descontaminação dos dejetos infectados e das gaiolas dos animais antes da higienização; acesso limitado e sinalização para alerta de riscos.	Barreira parcial guichê de desinfecção; uso de dispositivo de proteção pessoal (máscara, respiradouro etc.) para a manipulação de agentes ou animais infectados que produzem aerossóis.	Básicas
Nível 3 Elevado risco individual e baixo risco comunitário – causa doença grave ao homem ou ao animal.	Práticas do nível 2, mais uniforme especial e acesso controlado.	Os do nível 2, porém, devem ser usados para todos os tipos de manipulações com animais infectados.	Alta Segurança
Nível 4 Elevado risco individual e comunitário – causa doença incurável ao homem ou ao animal.	Prática do nível 3 mais troca de roupa de rua por uniforme especial em vestiário; ducha na saída; descontaminação de todos os objetos antes de sua retirada do infectório.	Barreiras máximas, isto é, nível 3 de segurança biológica ou barreira parcial em combinação com: proteção total do corpo com uma peça única dotada de ventilação e pressão positiva, gaiolas dotadas de filtros, estantes com fluxo laminar, etc.	Segurança máxima.

Fonte: ANDRADE *et al.* (2002)

A classificação e enquadramento dos biotérios em níveis de biossegurança permite uma melhor avaliação, indentificação e aprimoramento das barreiras sanitárias nas instalações existentes, aquisição de equipamentos adequados de proteção individual/coletiva e treinamento específico da equipe de usuários. Essas medidas

objetivam não só a supressão e/ou minimização de situações que possam trazer riscos laborais aos funcionários, como também prejuizos ao bem-estar dos animais alojados (ANDRADE-SILVA *et al*, 2012).

1.6. Caracterização ambiental

O biotério dever ser compreendido e analisado de acordo com a estrutura do macro e do microambiente. O macroambiente é o ambiente que abriga o microambiente, representado pelas dependências do alojamento dos animais, como por exemplo, as salas. Mesmo caracterizados separadamente o macroambiente influencia grandemente o microambiente com suas características próprias de estrutura e funcionamento (POLITI *et al*, 2008).

O microambiente é o espaço físico de maior proximidade com o animal, no caso são as gaiolas, que por sua vez apresentam variáveis próprias, tais como temperatura, ruído, umidade, composição gasosa e partículas do ar (figura 6). Apesar de ser difícil mensurar as características do microambiente, essa ação deve ser feita com muito cuidado e critério, pois manter os animais em recintos descontrolados podem induzir mudanças nos processos metabólicos, fisiológicos e/ou alterações na suscetibilidade desses animais às doenças (NRC, 2003).

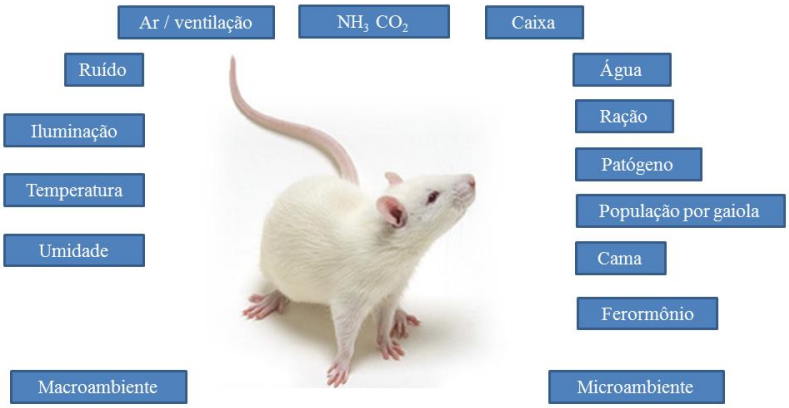


FIGURA 6 – Parâmetros ambientais do micro e macroambiente que podem interferir na saúde e bem-estar dos animais de laboratório (adaptado de BAUMANS, 2007).

1.7. Alojamentos

O nível de biossegurança, de acordo com Wolfensohn e Lloyd (2003) está diretamente relacionado à escolha do tipo de alojamento dos animais. Essa escolha deve objetivar a minimização de variáveis interferentes, tais como, doenças infecciosas, exposição a toxinas ou variações no ambiente, para que se possa garantir a segurança biológica adequada para o nível de estado microbiológico dos animais. De modo geral, as gaiolas devem ser feitas a partir de material inócuo, de fácil higienização e esterilização, e deve ser capaz de resistir às tentativas de fuga. As descrições a seguir estão em ordem crescente de acordo com nível de biossegurança.

- Alojamento convencional – Essa modalidade de habitação é composta por gaiolas abertas à atmosfera da sala de animais do biotério. As gaiolas normalmente são posicionadas em prateleiras de estantes, também abertas à atmosfera local. Apesar de ser uma opção barata, durável e fácil de limpar, esse alojamento não fornece nenhuma barreira para microrganismos patogênicos, portanto os animais ficam expostos a agentes infecciosos. Se não houver critérios no controle da climatização e ventilação das salas também estarão expostos a sofrimento por desconforto climático (Figura 7a).
- Gaiolas de isolamento com filtros (*top-filter*) e sem ventilação forçada - São gaiolas convencionais que possuem filtros individuais acima da sobretampa. A contenção de microrganismos é feita pelo filtro que fica em encaixe perfeito com a tampa, ou seja, todo ar que entra na gaiola necessariamente passa pelo filtro. Como o ar no interior das gaiolas fica restrito, ou seja, sem ser retirado, é necessário uma compensação no microambiente, aumentando a frequência de trocas de gaiolas, escolha do material de cama, colocação das gaiolas em um recinto secundário mais ventilado, diminuir a densidade populacional em seu interior, diminuir a umidade relativa do macroambiente para melhorar o microambiente e a dissipação de calor. A utilização desse modelo é desestimulada devido à dificuldade de controle do ar no microambiente, em função de sua rápida saturação de gás de amônia e umidade excessiva(Figura 7b).
- Estantes ventiladas - Semelhantes a armários fechados, estes equipamentos possuem seu próprio suprimento de ar filtrado. O ar retirado das gaiolas ventiladas deve ser descarregado diretamente no sistema de dutos de exaustão de ar da sala, para redução da carga térmica e para evitar a contaminação do

macroambiente com amônia, por exemplo. No interior da estante, geralmente, são utilizadas gaiolas abertas. (Figura 7c).

- Sistemas de gaiolas ventiladas individualmente (Individually Ventilated Cages – IVCs) – Esse modelo de alojamento se constitui de gaiolas plásticas de policarboneto com filtros na tampa. As gaiolas ficam em uma estante especial, que fornece suprimento de ar individual para cada uma das gaiolas e o ar é insuflado e exaurido diretamente das gaiolas de forma exclusiva (Figura 7d). O ar é filtrado por filtros HEPA a uma taxa de renovação total de ar que pode variar de 30 a 100 trocas por hora, de acordo com Reeb *et al*. (1998), mantendo a integridade do microambiente e reduzindo o acúmulo de contaminantes e poluentes. Neste caso, é necessário que os animais sejam manipulados e as gaiolas sejam trocadas em cabine ou estação de troca de gaiolas. Os IVCs fornecem aos animais um ambiente totalmente controlado em relação à ventilação, temperatura e umidade relativa. Este sistema propicia boa saúde e bem estar dos animais, permitindo assim a redução de indivíduos a serem utilizados em pesquisas (MAJEROWICS, 2003; KALISTE; MERING, 2007).
- Isolador flexível ou rígido – Esse equipamento, em geral, é utilizado para animais de padrão sanitário definido (Germ Free, Gnotobiótico e SPF) e imunodeficientes. O isolador é como uma grande bolha de plástico e seu interior é totalmente isolado do mundo exterior. O ar que entra no sistema é filtrado e qualquer ítem (alimentos, água, etc.) que adentrar o equipamento deve ser esterilizado ao passar pelo porto de passagem. Para tanto o isolador deve operar sob pressão positiva com filtro do tipo HEPA na entrada e na saida do ar, oferecendo proteção completa aos animais contra possíveis contaminantes. O equipamento também pode ser utilizado para isolar animais contaminados com patógenos e em regime de quarentena Neste caso deve ser utilizado o isolador de pressão negativa (Figura 7e).

Os alojamentos devem atender também as necessidades de espaço físico em relação aos efeitos do alojamento, proporcionando um ambiente capaz de suprir as necessidades fisiológicas básicas dos animais, tais como, capacidade de descansar, explorar, roer, se alimentar, se reproduzir, esconder, socializar, ou qualquer outro comportamento próprio da natureza do animal (ROMANO, 2009).

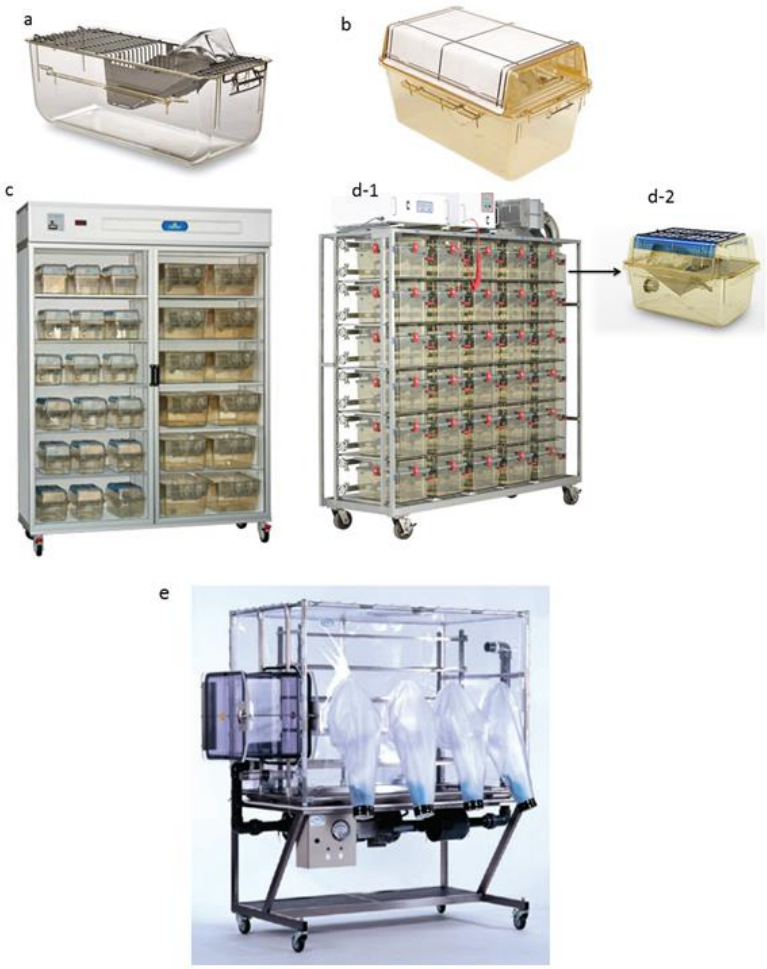


Figura 7- Tipos de alojamentos para animais de laboratório, segundo o grau de biossegurança: a- Alojamento Convencional, composto apenas pela gaiola e com grande dependência das condições climáticas do macroambiente; b- Gaiolas de isolamento com filtros e sem ventilação forçada (top-filter), proporcionam uma barreira aos poluentes e microrganismos em seu interior, mas apresentam dependência das condições climáticas do macroambiente; c- Estantes ventiladas, locais que possuem seu próprio suprimento de ar filtrado, o ar é compartilhado por todos os animais alojados na estante, esse modelo apresenta condições climáticas independentes do macroambiente; d-1- Sistemas de ventilação individual, composto por gaiolas que recebem ar de forma individualizada em uma estante de ventilação forçada, que oferece um microambiente controlado e independente em cada gaiola; d-2- Modelo de microisolador ventilado; e- *Flexible film isolators* consiste em um recinto de plástico, como se fosse bolha, isolado do ambiente externo e com as condições ambientais internas totalmente controladas (TECNIPLAST IND. E COM.; ALESCO IND.E. COM.; ALLENTOWN IND.E. COM).

Dentre as variáveis que podem interferir no bem estar e no comportamento dos animais estão: tamanho da gaiola, densidade populacional, incluindo espécie, fenótipo, linhagem (e seu comportamento social), idade, sexo, qualidade do espaço (por exemplo, disponibilidade de uso do espaço vertical) e os dispositivos colocados na gaiola, entre outros. Os cuidados com tais parâmetros devem ser considerados e cautelosamente analisados, evitando-se sofrimento aos animais e prejuízos à pesquisa

realizada A tabela 2 apresenta as recomendações mínimas de espaço físico para alojamento de roedores e lagomorfos (CONCEA, 2013).

Tabela 2 - Recomendações de espaço mínimo para roedores alojados em grupos.

Espécie		Peso (g)	Área/Animal (cm^2)	Altura (cm^2) [D]
Camundongos	Em grupos [A]	<10	38,7	12,7
		10 a 15	51,5	12,7
		15 a 25	77,4	12,7
		>25	>96,7	12,7
	Fêmea com filhotes[B]		300 (espaço para o grupo)	12,7
Ratos	Em grupos [A]	<100	109,6	17,8
		100 a 200	148,35	17,8
		200 a 300	187,05	17,8
		300 a 400	258,0	17,8
		400 a 500	387,0	17,8
		>500	>451,5	17,8
	Fêmea com filhotes[B]		800 (espaço para o grupo)	17,8
Hamster [A] [C]		<60	64,5	15,2
		60 a 80	83,8	15,2
		80 a 100	103,2	15,2
		>100	>122,5	15,2
Cobaia [A] [C]		<350	387,0	17,8
		350	≥651,5	17,8

A- Animais com dimensões maiores podem necessitar de maior espaço para seu adequado crescimento. Devem-se considerar também as características de crescimento, tamanho do grupo e sexo dos animais, prever se haverá ganho de peso rápido, se preferível proporcionar um espaço maior na expectativa futura de tamanho do animal, bem como considerar que roedores jovens são muito ativos e brincam frequentemente.

B- Avaliar o modo de reprodução, pois pode haver variações no número de adultos e filhotes, tamanho e idade dos animais.

C- Considerar possíveis seletivas de filhotes ou separação de ninhadas do grupo para permitir melhoramento, bem como segurança e bem estar ao grupo. O espaço deve ser suficiente para que as mães e sua respectiva ninhada consigam se desenvolver até o desmame, sem qualquer efeito prejudicial para ambos.

D- Distância do assoalho ao topo da gaiola.

Fonte: Adaptado CONCEA (2013).

1.8. Filtros de ar

A utilização de filtros como parte do sistema de ventilação permite a retenção de particulados indesejáveis, reduzindo ou impedindo a entrada de contaminantes no biotério. A capacidade de retenção dos filtros depende do material com o qual é confeccionado. Para assegurar o padrão sanitário definido dos animais devem ser utilizados filtros absolutos do tipo HEPA (High Efficiency Particulated Air), pois alcançam uma eficiência de 99,99% na retenção de partículas maiores que 0,3 micrômetro (MAJEROWICZ, 2003).

1.9. Cama

O material de cama, que forrageia a gaiola, deve preencher uma série de requisitos: deve fornecer calor; ser confortável para o animal descansar; absorver a urina, não pode ser tóxico, ser relativamente livre de poeira; não oferecer risco de desidratação aos neonatos, não ser oriundo de madeiras resinosas; ser desprovido de cheiro; ser facilmente descartável; ser facilmente transportado; manuseado e estocado. Existem variados materiais de cama, tais como maravalha de madeira (em forma de lascas – p.e. *Pinnus sp*), casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar desidratado, sabugo de milho ou outro produto, dependendo da facilidade de obtenção e do custo. Devido ao seu contato íntimo com os animais, o material da cama deve necessariamente ser descontaminado antes de ser oferecida nas gaiolas, a autoclavagem é uma opção indicada e eficaz para esterilização desse tipo de material (COUTO, 2002c).

Grande parte das espécies de animais confinados necessita ter certo controle do seu microambiente. As gaiolas, além de oferecer dimensões adequadas, devem possuir certa complexidade. O animal deve ser capaz de criar espaços separados para dormir, defecar, urinar, comer e brincar. A cama serve de auxílio para que os animais possam exercer algumas dessas atividades, além de oferecer ajustes na temperatura, umidade, luz, entre outros parâmetros que possam alterar o estado fisiológico ou psicológico dos animais (WOLFENSOHN; LLOYD; 2003).

A frequência e a intensidade da limpeza dos alojamentos devem ser suficientes para proporcionar um ambiente saudável para os animais, eliminando a possibilidade de contaminação pelas fezes e intoxicação pelos gases. Os principais gases capazes de

produzir toxicidade sistêmica são o gás carbônico (CO_2) e o gás de amônia (NH_3), que tem sua formação decorrente da hidrólise da uréia por bactérias urease positiva presentes nas fezes e urina dos animais. O acúmulo do gás de amônia, por exemplo, pode afetar o sistema respiratório destes animais, favorecendo a incidência de infecções secundárias (MAJEROWICZ, 2005). As concentrações dessas moléculas nas gaiolas são influenciadas por parâmetros como: ventilação, umidade relativa, arquitetura das gaiolas, número e sexos dos animais pertencentes à mesma gaiola, estado sanitário dos animais, alimentação entre outros (ROSENBAUM *et al*, 2010).

Não existe uma frequência mínima fixa para a troca de gaiolas, normalmente ela varia entre trocas diárias e semanais. Existem casos em que a troca frequente da cama não é indicada, como por exemplo, em períodos de acasalamento, pré ou pós-parto, pois os feromônios presentes no material são importantes para o sucesso reprodutivo (NRC, 2003).

1.10. Temperatura e umidade

As espécies escolhidas para serem utilizadas em pesquisas geralmente são homeotérmicas, ou seja, possuem a capacidade de regular a temperatura corpórea, dentro de uma faixa de temperatura específica, que varia de acordo com a espécie, por meio de variações de sua taxa metabólica. Instabilidades na temperatura ocasionam inconstâncias metabólicas, ou seja, medidas fisiológicas compensatórias, como por exemplo, mudanças no padrão da circulação periférica e do comportamento, podendo ocasionar estresse no animal, queda da resistência imunológica e irreprodutibilidade nas pesquisas. Por este motivo, os locais de confinamento devem ter a temperatura monitorada evitando-se variações (CLOUGH 1982; HANSEN; BAUMANS, 2007).

A umidade relativa do ar (URAr)é um parâmetro de grande importância para garantir o bem-estar dos animais. A maioria dos animais tolera bem a faixa entre 40 e 60% de umidade relativa do ar, começando a ter problemas quando esta chega a 30% ou quando é superior a 70%. A URAr no microambiente é da maior importância para animais alojados em recinto primário, como por exemplo, gaiola com “top filter”. Dentre os fatores que podem interferir na temperatura e umidade dos alojamentos, destacam-se: o tipo de material utilizado na confecção das gaiolas; dispositivos de enriquecimento ambiental, tais como abrigos e túneis, uso de filtros nas gaiolas (“top

filters"), número, idade, espécie e tamanho dos animais em cada gaiola; ventilação do recinto e o tipo e freqüência de troca da cama (CONCEA, 2013).

Para pequenos roedores a temperatura ambiental varia de 18°C a 26°C ± 1°C, desde que haja 15 trocas de 100% do ar/hora associados à umidade relativa do ar de 50% ± 10%, de acordo com o *Canadian Council on Animal Care* (2003). Cobaias e coelhos se adaptam melhor a temperaturas de 18ºC a 22ºC com URAr de 50% a 60% (SACHSER et. al, 2007; LIDFORS *et al*, 2007). No microambiente a temperatura pode aumentar de 3ºC a 5ºC, e esse acréscimo deve ser previsto e gerenciado, para não trazer desconforto aos animais. Existem situações que o aumento da temperatura no ambiente deve ser providenciado, como por exemplo, no alojamento de animais em recuperação pós-operatória, animais recém-nascidos e roedores com fenótipo sem pelo (NRC, 2003).

1.11. Ventilação, Exaustão e Qualidade do Ar

A ventilação e a exaustão são responsáveis por garantir um aporte de ar adequado aos animais alojados, remoção e /ou atenuação da carga térmica provenientes da respiração, da iluminação e de equipamentos elétricos em funcionamento, assim como, diluição e exaustão de contaminantes gasosos e particulados (NRC, 2003; CONCEA, 2013).

A ventilação do ambiente pode ser classificada da seguinte forma: Ventilação Geral, natural ou mecânica, também conhecida como Ventilação Geral Diluidora (VGD); e Ventilação Local Exaustora (VLE) (Figura 8) (LAINETTI, 2009; LIED, 2011).

- A ventilação local exaustora (VLE) retira as substâncias emitidas diretamente do local de geração, conduzindo-os para a atmosfera externa. Esse método é altamente seguro em barrar a dissipação de contaminantes nos ambientes fechados, preservando a saúde dos animais e usuários do local.
- A ventilação geral diluidora (VGD) é um método baseado em insuflar ar em um ambiente, com a finalidade de promover uma redução na concentração de poluentes nocivos. Quando introduzimos ar limpo ou não poluído em um ambiente, a massa de ar se dispersa ou dilui em um volume maior de ar, reduzindo, portanto, a concentração desses poluentes. Isso não impede a emissão dos poluentes para o ambiente, mas simplesmente os dilui. A

desvantagem desse método em biotérios ocorre pelas diferenças atmosféricas que se estabelecem entre a sala de animais (macroambiente) e o interior da gaiola (microambiente). Ocorre que a massa de ar que atinge o interior de cada gaiola fica mais restrita pela maior dificuldade em ser retirada deste microambiente, acumulando poluentes e calor, o que torna o alojamento dos animais um local estressante, desconfortável e deletério à sua saúde.

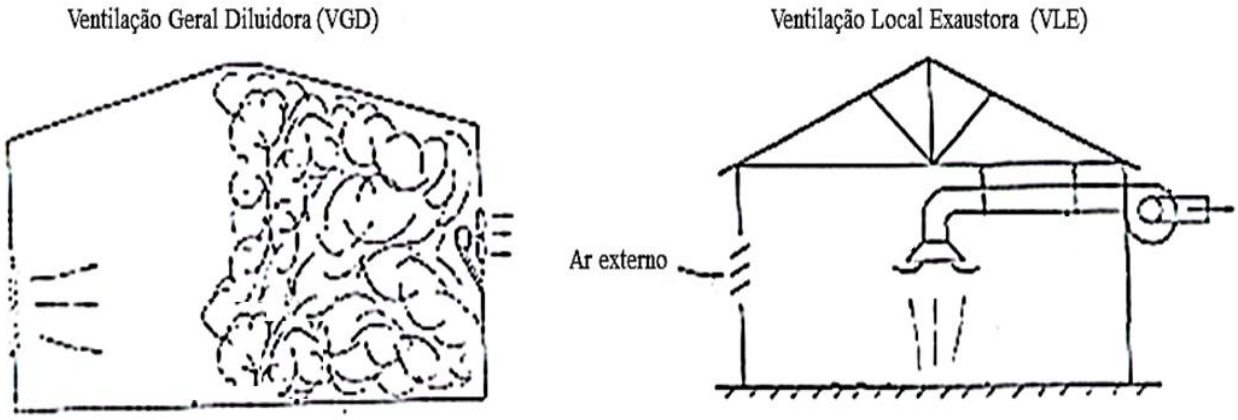


Figura 8 – Esquema demostrando o funcionamento geral do método de ventilação Geral diluidora, insufluar ar e diluir os poluentes, e da ventilação local exaustora, que retira os poluentes no local de produção (ROQUE *et al*, 2011).

A qualidade do ar para os animais no biotério é assegurada pela renovação do ar, ou seja, deve haver um número de trocas de 100% do ar por hora, em cada sala de animais. De acordo com o CONCEA (2013) essas trocas devem ser de 15 a 25 por hora, pois desta forma garante-se também um volume constante de ar nos microambientes. As trocas de ar devem ser feitas com 100% de renovação, pois o ar reciclado da própria sala ou compartilhado de outras salas oferecem riscos de contaminação cruzada por microrganismos patogênicos e poluentes aos animais e funcionários. Nos casos em que o ar de exaustão é reciclado, este deve ser filtrado, no mínimo, com filtros de eficiência ASRHAE (*The American Society of Heating, Refrigeration, and Air Conditioning Engineers*) entre 85 a 95%, para remoção dos particulados presentes, antes de ser reutilizado.

1.12. Luminosidade

Inadequações na iluminação das salas dos animais podem afetar a fisiologia, a morfologia e o comportamento dos mesmos. A luz é um fator sincronizador do ritmo circadiano (duração do dia). Alterações neste parâmetro podem desencadear inúmeros distúrbios metabólicos, tais como, na reprodução, que é controlada em grande parte dos animais pelo ritmo circadiano, uma vez que o estímulo da luz produz variação nos níveis hormonais, de modo que, períodos prolongados de iluminação ou de escuridão interferem no ciclo reprodutivo dos animais (NRC 2003; WOLFENSOHN; LLOYD; 2003).

As variações sazonais são corrigidas com a manutenção de fotoperíodos de 12 h de luz : 12 h de escuro ou 14 h de luz e 10h de escuro. Deve-se buscar promover a mudança de localização de cada gaiola em relação à fonte de luz ou proporcionar meios físicos para que os mesmos modifiquem sua exposição à luz, através de comportamentos, como construir ou entrar em túneis para se refugiarem. São importantes mecanismos de controle da variação da intensidade luminosa (NRC, 2003; LAINETTI, 2009).

A luz deve ser artificial, por meio de luz fria, pois a maioria dos animas de laboratório são roedores noturnos e esse tipo de luz causa menos irritação em relação à incandescente, que é ainda desaconselhada por aquecer inadequadamente o ambiente. Também deve-se evitar a luz natural, devido à variabilidade que a mesma apresenta ao longo do dia, sendo capaz de proporcionar a desregulação da homeostase animal. A iluminação deve abranger toda a sala, possibilitando a inspeção das gaiolas e as rotinas com os animais, ao mesmo tempo em que assegure o bem estar animal. Para garantir o controle do fotoperíodo nas salas dos animais devem ser empregados temporizadores (LAINETTI, 2009; CONCEA, 2013).

Recomenda-se que a intensidade de luz dentro da gaiola, não ultrapasse 60 lux (lumens/m^2), e para animais albinos a intensidade deve ser menor que 25 lux. Na sala de animais de laboratório, pode-se utilizar a seguinte referência: 350 a 400 lux um metro acima do chão, diretamente debaixo da fonte de luz. Esta intensidade se mostra adequada aos animais e previnem patologias como a retinopatia fototóxica em ratos albinos (LAINETTI, 2009; CONCEA, 2013).

1.13. Ruídos

O ruído é um parâmetro importante que deve ser levado em consideração no projeto e no funcionamento de um biotério, pois podem exercer efeitos negativos sobre os animais confinados. Biotérios apresentam ruídos de várias fontes, as principais são provenientes das atividades de rotina e equipamentos, tais como, limpeza, vocalizações de pessoas e animais, portas ao baterem, funcionamento dos equipamentos, localização do próprio biotério, etc. (NRC, 2003).

As emissões sonoras são avaliadas por duas características: intensidade, medida em decibéis (dB) e frequência, medida em Hertz (Hz). Muitas espécies de animais, incluindo os de laboratório, podem ouvir frequências sonoras que são inaudíveis para os humanos, os infrassons e os ultrassons. Animais e humanos apresentam, dentro de suas faixas de frequências de audição as denominadas faixas de sensibilidade, ou seja, um ou mais intervalos de frequência nos quais é maior a percepção da intensidade do som, portanto muitas fontes de ruído podem passar desapercebidas pela audição humana e ocasionar grande estresse nos animais (tabela 3) (DE LUCA, 1996; NRC, 2003; HEFFNER, 2007).

Tabela 3 – Intervalo de frequência e faixa de sensibilidade auditiva para diferentes espécies

Espécie	**Faixa auditiva (dB)**	**Faixa de sensibilidade (dB)**
Camundongo	0.75 a 85	10 a 20; 55 a 65
Hamster	0.35 a 60	1 a 10
Rato	0.1 a 65	35 a 40
Cobaia	0.1 a 35	0.2 a 1
Coelho	0.1 a 40	0.7 a 5
Cão	0.1 a 55	0.5 a 30
Homem	0.02 a 20	0.7 a 8

Fonte: Adaptado de Clough (1982).

A influência do som nos animais de laboratório pode ser dividida em dois grandes grupos: efeito auditivo, relacionado às lesões experimentais provocadas por ruídos de intensidade e frequências variadas e efeitos não auditivos, como por exemplo, ruídos irregulares e/ou inesperados. Em roedores, os efeitos não auditivos têm sido relacionados a alterações fisiológicas, tais como a hipertensão, hipertrofia cardíaca,

alterações no metabolismo de eletrólitos, alterações nas respostas imunes, ciclo estrais irregulares, diminuição de peso e gestação interrompida (ÁVILA, 2012).

De acordo com Animal Research Review Panel (ARRP, 2012), as recomendações abaixo podem ser importantes para reduzir as fontes de ruídos pertencentes ao espectro da audição humana, ultra e infrassons:

- Atividades potencialmente ruidosas devem ser realizadas em áreas ou salas separadas dos locais destinados aos alojamentos dos animais.
- Computadores ou qualquer outro equipamento que possam emitir ultrassons, não podem ser utilizados em espaços onde os animais são alojados. Se o uso de tais equipamentos é inevitável, alguns cuidados devem ser tomados, como por exemplo, embalá-los em espuma de poliestireno, como medida atenuante.
- Rádios, alarmes e outros geradores de som não devem ser utilizados nas salas dos animais, a menos que eles sejam parte de um protocolo aprovado ou de um programa de enriquecimento ambiental.
- Os alojamentos devem ser livres de vibrações de qualquer natureza, sobretudo as que atinjam as gaiolas.
- Os alojamentos com sistema de ventilação individual devem ser monitorados para evitar vibrações e ruídos provenientes da ventilação.

1.14. Alimentação e Água

O alimento oferecido aos animais de laboratório deve atender as necessidades nutricionais e também comportamentais de cada espécie. O aspecto nutricional se baseia no oferecimento de uma dieta apropriada que supra as necessidades metabólicas dos animais em uma consistência física adequada para seu consumo. A ração peletizada representa a forma mais tradicional de alimentação dos animais de laboratório, porém essa prática torna a alimentação monótoma, pois os animais são privados de variedades de texturas e sabores, que podem ser supridos com a inserção de alimentos naturais (KALISTE; MERING, 2007; BALCOMBE, 2009).

A ingestão de alimento é influenciada pelo conteúdo de energia da dieta e fatores ambientais, tais como a temperatura, ciclo de luz, práticas de manejo dos

animais como alojamento em grupo, enriquecimento ambiental, gaiolas com design restritivo, entre outros (KEENAN *et al*. 1999).

A taxa de consumo do alimento tem influência sobre a saúde e bem-estar dos animais. A alimentação *ad libitum* pode ocasionar obesidade, diminuição na sobrevivência e incidência de tumores em animais idosos. A restrição moderada de alimento (redução de 25%) está relacionada a um melhor controle do peso do animal adulto, aumento da sobrevivência e melhoria do estado geral de saúde, enquanto que a restrição grave (redução de 40 a 50%) não é recomendada e pode ocasionar graves danos à saúde dos animais (KEENAN *et al*. 1999; KALISTE; MERING, 2007).

Os animais devem ter acesso contínuo à água potável de acordo com suas necessidades individuais. A água oferecida deve ser potável e de boa qualidade. Para garantir a qualidade desse recurso é importante que se monitore o grau de potabilidade, mensurando-se o pH, composição mineral, grau de contaminação microbiana ou química da água. A água normalmente é oferecida aos animais, por meio de bebedouro com bicos de aço ou bebedouros automáticos. Esses objetos devem ser examinados diariamente para que se possa garantir a limpeza e correto funcionamento (NRC, 2003).

1.15. Enriquecimento ambiental e bem-estar animal

Os animais de laboratórios são parcialmente adaptados à vida em cativeiro, mantendo similaridades comportamentais e instintos próprios de seus homólogos selvagens. Os alojamentos devem atender às necessidades fisiológicas e comportamentais compatíveis com a espécie. A quantidade de indivíduos por gaiola é variável de acordo com a espécie, algumas preferem um ambiente social e outras são solitárias, preferindo a privacidade (por exemplo o hamster fêmea) (KALISTE; MERING, 2007).

Uma alternativa para melhorar o ambiente dos animais de laboratório se baseia em oferecer oportunidades para que esses animais executem repertórios comportamentais específicos de sua espécie, por meio de enriquecimento. O enriquecimento ambiental se baseia na modificação do ambiente com a finalidade de melhora-lo em relação ao seu funcionamento biológico. Essa prática tem sido introduzida nas instalações de pesquisa com grande aceite, devido aos seus comprovados ganhos no que se refere ao bem-estar animal (BAUMANS 2004).

O enriquecimento ambiental possui estratégias diversificadas que devem ser direcionadas para o estímulo de comportamentos importantes para a espécie, como por exemplo, forrageamento, construção de ninhos, exploração e convívio social. O enriquecimento deve ser considerado como um parâmetro essencial no programa global de cuidados com os animais. Todas as decisões relacionadas com o enriquecimento devem ser incluídas nos procedimentos operacionais padrão da instituição de pesquisa, de modo a padronizar as abordagens e facilitar a aceitação de pesquisadores e de pessoas ligadas à gestão dos animais. Além disso, bancos de dados devem ser criados com informações e critérios que devem servir de apoio à introdução e avaliação dos diferentes tipos de enriquecimento (STEWART, 2004; BAUMANS, 2005; HUTCHINSON *et al*, 2005).

De acordo com Baumans (2005) o enriquecimento ambiental pode ser categorizado como: enriquecimento social (social inclui a sociabilização dos animais com o contato e/ou sem contato com animais da mesma espécie e/ou contraespecífico "contraspecifics", incluindo humanos), físico e nutricional. A abordagem a seguir é baseada no enriquecimento de roedores e coelhos.

- Enriquecimento social por contato - As espécies gregárias devem ser alojadas em grupos ou pares da mesma espécie. A maneira ideal de se estabelecer grupos é alojando indivíduos da mesma ninhada, mas esse arranjo pode não ser possível na maioria dos casos, devido à dimensão do grupo e possível viés no estudo. A composição do grupo social deve ser observada em relação ao número de indivíduos e harmonia, porém muitas vezes se faz necessário o fornecimento de barreiras visuais ou esconderijos para minimizar as agressões. Para os animais sociais o fato de ter um parceiro social representa um desafio, pois cria uma situação nova e imprevisível a qual o animal deve reagir, aumentando o estado de alerta, comportamento exploratório e sentimento de segurança. O contato social dos animais inclui também o contato com seres humanos (por exemplo, a manipulação, treinamento e socialização). Essa medida pode trazer benefícios à cognição dos animais, tornando suas relações mais complexas, auxiliando positivamente os resultados das pesquisas, além de permitir uma interação estável entre animais, cuidadores , técnicos e cientistas.
- Enriquecimento sem contato social – O enriquecimento sem contato social inclui estratégias de comunicação visual, auditiva e olfativa entre membros da mesma espécie, por meio de barras ou malha. Essa medida deve ser adotada quando não

há a possibilidade de habitação em grupo aos animais. Porém essa abordagem pode ser aversiva aos animais quando em situação de exposição contínua sem a possibilidade de escapar ou refugiar-se.

- Enriquecimento físico - O enriquecimento físico inclui a inserção de objetos de interação sensorial. A interação sensorial inclui a oferta de uma estrutura ambiental complexa que possibilite aos animais controlarem seu ambiente em termos de iluminação e separação de espaços próprios para descanso, alimentação e excreção. Essa abordagem pode ser alcançada disponibilizando-se caixas para ninhos, materiais para fabricação de ninhos, tubos e divisórias que podem servir como esconderijos e plataforma para exploração visual do ambiente externo ao alojamento (figura 9). O oferecimento de material para ninho, em especial, tem sido atrelado à redução de pré-desmame e mortalidade na ninhada.
- Enriquecimento nutricional - O enriquecimento nutricional envolve o oferecimento de itens comestíveis, além da alimentação rotineira. Essa abordagem permite aos animais a oportunidade de exercer atividades próprias de sua natureza, como por exemplo, o forrageamento, ato de espalhar alimentos pela cama. Itens adicionais como feno, palha, ou cubos de grama podem satisfazer a necessidade, por exemplo, de cobaias e coelhos de mastigarem grandes volumes. Oferecer blocos de madeira macia permite a alguns roedores aumentar seu material de cama e ainda formar abrigos apropriados.

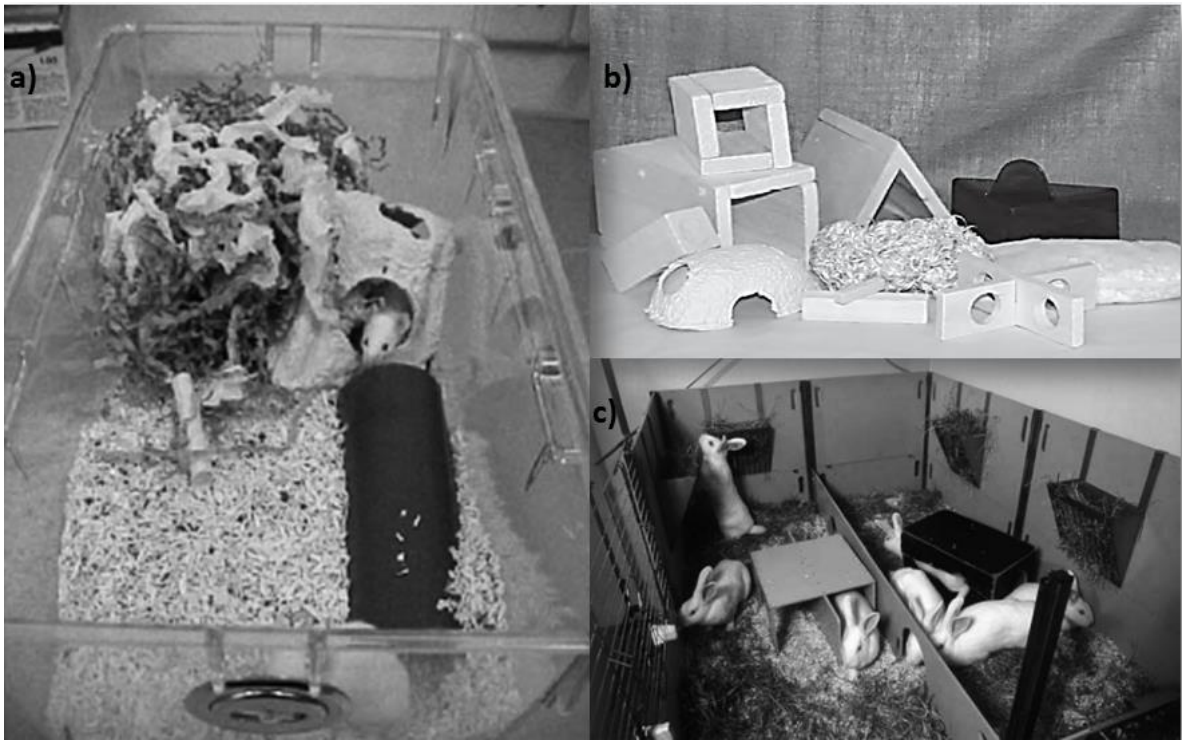


Figura 9 – Exemplos de enriquecimento ambiental. a) Gaiola de camundongo enriquecida com tubo e casinha de papelão e material picado de papel e raspa de madeira para fabricação de ninho e abrigo. b) Exemplo de objetos que podem ser utilizados para o enriquecimento de alojamento para roedores. c) Exemplo de habitação enriquecida para coelhos (BAUMANS, 2005; KALISTE; MERING, 2007).

O conceito de bem-estar animal de acordo com Costa e Pinto (2006) abrange o estado psicológico do animal (sentimentos, sofrimento, dor, ansiedade, medo, tédio, estresse); o funcionamento biológico do animal (equilíbrio de funções orgânicas, capacidade de crescimento, reprodução, comportamento adequado, boa nutrição etc.) e a vida natural (animais em ambientes similares ao habitat natural).

Traçar medidas que visem o bem-estar dos animais é sempre um desafio. Para isso é necessário ter conhecimento sobre a biologia do animal e criteriosas observações, que visem constatar anormalidades comportamentais ou fisiológicas, resultantes de necessidades não satisfeitas. Os efeitos sobre o bem-estar dos animais incluem aqueles provenientes de doença, traumatismos, fome, estimulação benéfica, interações sociais, condições de alojamento, tratamento inadequado, manejo, procedimentos laboratoriais, mutilações variadas, tratamento veterinário entre outras (BROOM; MOLENTO, 2004).

A redução significativa do nível de sofrimento dos animais pode ser alcançada através de uma melhora das interações entre o ser humano e os animais (uma atitude amável e compreensiva aos animais é muito importante), suprimento das necessidades específicas da espécie confinada, aprimoramento das técnicas

experimentais, e o uso de protocolos de anestesia, cirurgia, analgesia e eutanásia sem crueldade. Além disso, a contribuição desses fatores é essencial para a prática da boa ciência (MORTON, 2004).

2. Biotérios da USP

A UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP) possui uma grande rede integrada de biotérios ativos, que são responsáveis por um elevado volume de experimentos e publicações científicas. Dentre seus objetivos está o oferecimento de modelos biológicos de qualidade, através da padronização sanitária, genética e ambiental e de padronização de serviços e controle (COBEA, 2003).

Todos os biotérios pertencentes à USP devem possuir cadastro na Pró-Reitoria de Pesquisa (PRP), medida que visa traçar um panorama sobre as condições de funcionamento e infraestrutura de cada biotério, além de utilizar a base de dados para gerenciar e destinar recursos financeiros provenientes da Comissão de Orçamento e Patrimônio para aperfeiçoamento da Rede de Biotérios da Universidade (PRP-USP, 2015).

Apesar dos esforços burocráticos da instituição em manter sob controle as condições atuais de funcionamento dos biotérios, existem variáveis que podem interferir, como por exemplo, o não cadastramento de biotérios ou um montante financeiro insuficiente para atender todos os biotérios adequadamente.

Os biotérios da USP são de responsabilidade de departamentos ou unidades específicas e contam com a colaboração dos pesquisadores envolvidos para a construção e manutenção de ambientes adequados aos animais, porém estes locais não são de fato vistoriados por órgãos reguladores. Levando em consideração que fatores ambientais podem ter um efeito significativo na saúde e no bem-estar dos animais, e como consequência no resultado experimental, este trabalho tem por objetivo traçar o perfil físico e ambiental de biotérios pertencentes à USP, *campi* de Ribeirão Preto e São Paulo, onde se produzem significativas pesquisas envolvendo animais.

3. Materiais e métodos

Para traçar o perfil dos biotérios em funcionamento dos *campi* da USP de São Paulo (SP) e de Ribeirão Preto (RP) um questionário por nós elaborado foi distribuído a trinta e quatro biotérios e a participação ocorreu mediante a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, com compromisso de sigilo absoluto (Anexo 1). Os resultados foram obtidos a partir das respostas fornecidas por onze biotérios, sendo nove de RP e dois de SP. Com a finalidade de se manter sigilo sobre a identidade dos biotérios, estes foram tratados como B1(1-a), B2(1-b), B3(2), B4(3), B5(4), B6(5), B7(6), B8(7-a), B9(7-b), B10(8), B11(9), B12(10), B13(11). Para viabilizar a análise, dois biotérios foram subdivididos, pois possuem finalidades e/ou padrões sanitários distintos, estes são o biotério 1, subdividido em B1(1-a) e B2 (1-b) e o biotério 7, subdividido em B8 (7-a) e B9 (7-b).

As respostas fornecidas nos questionários foram descritas e comparadas com a literatura consultada para os seguintes itens: Status sanitário ou ecológico; divisão de áreas do biotério; barreiras sanitárias; desinfecção e esterilização; equipamentos de proteção individual; alojamentos; material de cama e periodicidade de troca das gaiolas; climatização; fotoperíodo; enriquecimento ambiental e presença de veterinário técnico.

4. Resultados e Discussões

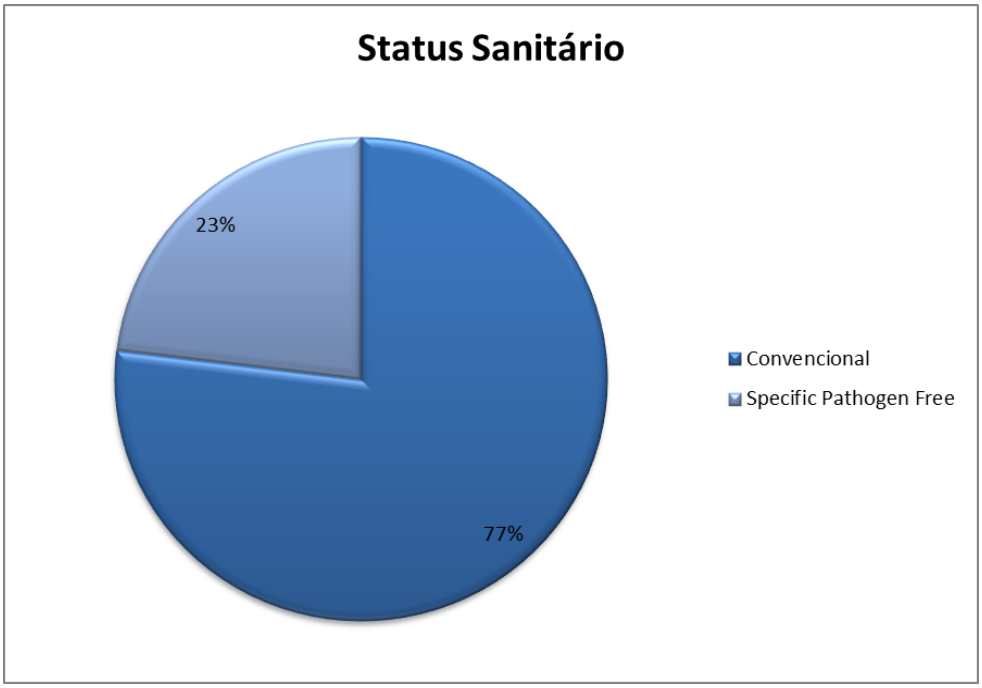
A maioria dos biotérios participantes possuem a finalidade exclusiva de experimentação, com sete biotérios nessa categoria; três biotérios são exclusivos para produção de animais e três possuem atividades conjuntas de produção e experimentação (Quadro 1).

Com exceção de um biotério, os demais possuem cadastro junto a Pró-Reitoria de Pesquisa (PRP). Apenas o biotério B6 não possuía cadastro ("Cadastro em andamento" - sic questionário), pois o local fora recém-adaptado para receber os animais que deveriam participar de um seguimento de experimento livre de interferências ambientais, tais como odores de perfume proveniente dos tratadores e usuários do biotério, e por isso foram transferidos para um espaço exclusivo, dentro do conjunto de salas do docente responsável.

4.1. Status sanitário ou ecológico dos biotérios analisados

A maioria dos biotérios analisados aloja mais de uma espécie animal, apenas um (B6) aloja uma única espécie. São dez biotérios de padrão sanitário convencional (B2, B3, B4, B5 B6, B7, B8, B10, B11 e B13) e três biotérios Específic Pathogen Free (SPF) (B1, B9 e B12) (Gráfico 1). A importância de se definir o *status* sanitário ou ecológico se baseia na diminuição ou abolição de erros por interferências por parte de possíveis contaminantes.

Gráfico 1 – *Status* Sanitário dos biotérios participantes da pesquisa.



Nos últimos 30 anos, a utilização de animais de padrão sanitário convencional ocorre predominante no meio científico. Estes animais apresentam microbiota indefinida e são mantidos em ambiente sem barreiras sanitárias rigorosas. A atenção dada à escolha dos animais nessa classificação leva em conta a possibilidade de que a microbiota seja o "participante" do estudo ou uma possível interferência (SEELIG, 2007).

Um ponto importante a ser destacado é o fato de, em alguns casos, haver confusão na interpretação das reais condições ambientais a serem oferecidas aos animais de padrão sanitário convencional. Apesar de não serem exigidas barreiras

sanitárias específicas, os responsáveis devem estabelecer como prioridade a manutenção de condições ambientais estáveis, para que os animais possam estar em plena condições de saúde (físicas e psicológicas), garantindo seu bem estar, confiabilidade e reprodutibilidade ao experimento. De acordo com Górska (2000), apesar do padrão sanitário convencional não exigir a utilização sistemática de um conjunto de barreiras sanitárias rigorosas, alguns requisitos são importantes para a sede de alojamento dos animais:

- O edifício deve ser livre de roedores silvestres e insetos;
- O número de pessoas com acesso aos animais deve ser restrito e todos devem lavar as mãos e usar EPIs (jaleco, luvas e touca);
- Oferecer alojamento adequado aos animais (microambiente) e adequadas condições climáticas no macroambiente;
- É importante manter as gaiolas, a comida, a cama e as salas sempre limpos e higienizados e sempre oferecer água potável e filtrada;
- Os animais de laboratório devem receber ração especial e gerenciamento dos resíduos produzidos.

A escolha do melhor modelo animal acompanha regras específicas, pois existem inúmeras considerações a serem feitas antes que o experimento possa ser realizado e variam de acordo com a especificidade e objetivos da pesquisa (FAGUNDES; TAHA, 2004). Quando existe mais de uma opção, a escolha deve levar em consideração linhagens com menos especializações, que geralmente são as linhagem filogeneticamente mais primitivas dentro de determinado grupo. Nesse sentido observa-se que 80% dos animais de laboratório utilizados nas mais diversas frentes de experimentos biológicos são roedores, por causa da facilidade de acesso e pelo ciclo de vida acelerado, tornando viável a reprodução e manipulação em cativeiro (SEELING, 2007).

A utilização de animais de laboratório específicos e qualificados é responsável pela diminuição do número estatisticamente necessário de indivíduos para atingir os objetivos do projeto (FAGUNDES; TAHA, 2004). Nesse sentido os geneticistas colocaram à disposição dos pesquisadores modelos animais para inúmeras patologias, disfunções ou malformações, em geral reproduzindo doenças similares às observadas na espécie humana, incluindo os animais geneticamente modificados (CHORILLI *et al*,

2007; SEELING, 2007). Alguns exemplos são os camundongos *nude*, *hairless*, *obese*, diabéticos, miodistróficos. Enquanto isso pode-se citar os ratos N:NIH que são imunodeficientes, os Sprague Dawley, susceptíveis a tumores de mama, e os SOD1-ALS, que são modelos transgênicos microinjetados para Esclerose Amiotrófca Lateral (ELA), entre outros.

Os animais utilizados nos biotérios analisados compreendem: ratos (*Rattus norvegicus*) 84% (n=11) dos casos; camundongos (*Mus musculus*) em 77% (n=10); coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) em 31% (n=4); cobaias (*Cavia porcellus*) em 23% (n=3); hamsters (*Mesocricetus auratus*) em 15% (n=2); gambás (*Monodelphis domestica*) em 7,7% (n=1) e Gerbil (*Meriones unguiculatus*) em 7,7% (n=1).

As linhagens de camundongos utilizadas pelos biotérios são: C57Bl/6 61% (n=8); Swiss webster 38% (n=5), BALB/c (38%) (n=5); BALB/c *nude* 7,7% (n=1); *Hairless* 7,7 (n=1); nocautes LDLr-KO 7,7 (n=1) e P2-GFP 7,7 (n=1). As linhagens de ratos foram: Wistar 77% (n=10); Wistar Kyoto 7,7% (n=1); Wistar-Hannover 7,7 % (n=1); Sprague Dawley 7,7% (n=1); N:NIH (*nude*) 7,7% (n=1) e SOD1-ALS (transgênico) 7,7% (n=1).

A escolha do modelo animal deve ser prevista no desenho experimental, pois é necessária a existência de uma correspondência entre ambos com a situação de vida da espécie alvo. Se o desenho visa representar dados com base nas respostas biológicas dos organismos em condições “normais” de vida e isso for realizado de forma inadequada, então conclusões errôneas podem ser geradas, independente do valor do modelo (FAGUNDES; TAHA, 2004).

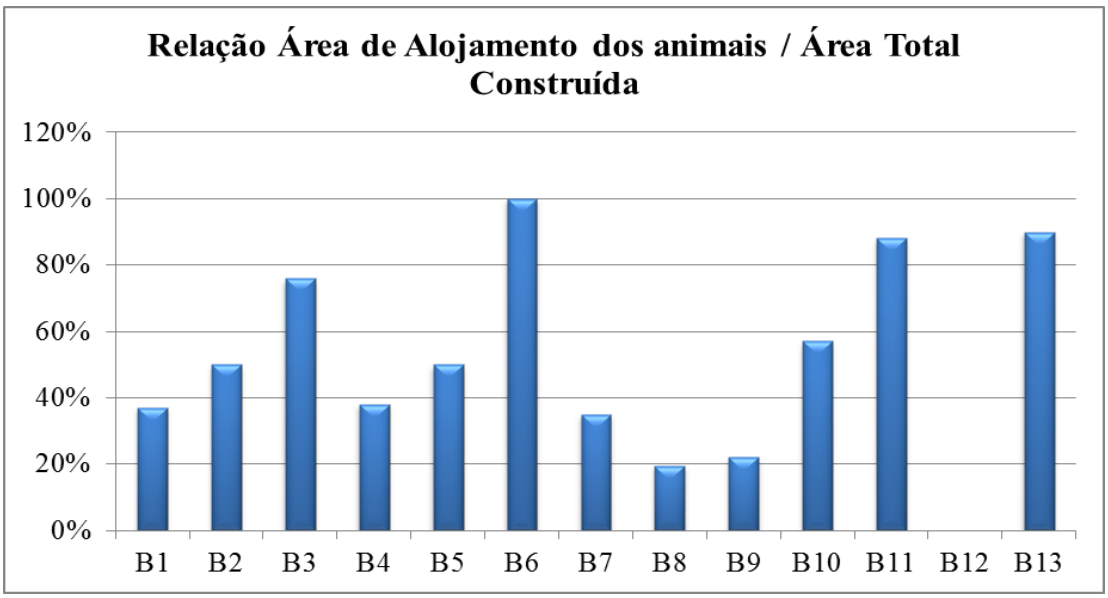
4.2. Divisão de áreas do biotério

As instalações pertencentes a um biotério devem possuir independência total de suas áreas, de acordo com seu funcionamento. A área do biotério deve apresentar duas divisões principais: o espaço reservado para a habitação dos animais e o espaço de atividades de suporte. As áreas de apoio de um biotério compreendem subdivisões destinadas a escritórios, armazenamento de materiais, locais para higienização e esterilização de materiais e insumos, banheiros e vestuários, corredores, laboratórios, entre outros. Estas dependências devem estar próximas ao local do alojamento, mas separadas por barreiras físicas e sanitárias.

As áreas destinadas para o alojamento dos animais e as áreas de apoio diferenciam-se consideravelmente de acordo com o local designado para a construção do biotério, planejamento e objetivos do mesmo. De acordo com Couto (2002b) deve haver 46% da área total para sala de animais e quarentena e o restante para áreas de suporte. De acordo com Hau e Hoosier Jr. (2003) esses espaços variam entre 30:70 e 70:30, quanto menor for o biotério maior deve ser a porcentagem de espaço destinado para as áreas de suporte. De acordo com Rana (2008) as salas de animais devem ocupar cerca de 50 a 60% do total da área construída e as áreas remanescentes devem ser utilizadas para os demais serviços.

Nos biotérios analisados a área destinada exclusivamente aos animais em relação à área total do biotério variou de 35% a 100%, apenas um biotério não informou esse dado. O biotério que ocupa 100% da área faz parte de uma adaptação recente (mesmo biotério que não possui cadastro na PRP – B6) e depende das áreas de apoio de outro biotério no mesmo prédio, ambos pertencentes à mesma instituição. Dos biotérios informantes 66,6% (n=8) apresentaram distribuição física variando de 37% a 57% da área destinada para o alojamento de animais, e o restante da área estaria distribuído em corredores e áreas de apoio, como proposto internacionalmente. Os demais biotérios 33,3% (n=4) apresentaram uma ocupação da área total para alojamentos acima do recomendado pela literatura, variando de 76% a 100%, o que pode comprometer a eficiência global de funcionamento do biotério e comprometer a saúde e o bem estar dos animais (Gráfico 2).

Gráfico 2- Relação entre o espaço total do biotério e o espaço destinado aos animais.



4.3. Barreiras Sanitárias

As barreiras sanitárias consistem em combinações criteriosas de sistemas físicos (arquitetura) em conjunto com medidas sanitárias que visam minimizar a transferência, de um lado para outro da barreira sanitária, de agentes etiológicos causadores de doenças entre animais e humanos (*Canadian Council on Animal Care* – CCAC, 2003).

De acordo com Rosenkranz *et al*. (1978) na década de 70 e 80 os biotérios brasileiros não possuíam condições nenhuma para manter um ambiente com elevado padrão sanitário, para produção de animais SPF. No final da década de 90, Gilioli *et al* (2000) investigaram as condições de saúde de 15 colônias de camundongos e 10 colônias de ratos produzidos em 18 biotérios de instituições brasileiras que forneciam animais para ensino, pesquisa e produção de imunobiológicos de uso médico ou veterinário. Os autores concluíram que a maioria dos biotérios brasileiros, na época do desenvolvimento da pesquisa, era incapaz de produzir ou manter animais sob condições sanitárias controladas, e que eram necessários esforços contínuos e sustentados para melhorar a qualidade dos animais de laboratório criados no Brasil.

Seguindo a mesma linha de pesquisa Bicalho *et al* (2007) investigaram as condições sanitárias de 13 biotérios de nove instituições públicas do estado de Minas Gerais, bem como a presença de endo e ectoparasitos nos camundongos e ratos criados nesses biotérios. Os pesquisadores demonstraram que a maioria dos biotérios não possuía espaços físicos adequados nem barreiras de proteção que pudessem impedir a transmissão de infecções. Esse estudo corroborou com o anterior com relação à permanência de condições sanitárias ineficientes nos biotérios brasileiros analisados.

Baseado na necessidade de se diagnosticar as barreiras sanitárias dos biotérios analisados, o Quadro 1 apresenta algumas das medidas adotadas pelos biotérios do presente estudo. Cada item do Quadro será discutido separadamente em tópicos específicos, a seguir.

Quadro 1- Informações sobre algumas das barreiras sanitárias adotadas pelos biotérios USP (*campi* São Paulo (SP) e Ribeirão Preto(RP))

Biotérios **Padrão Sanitário**		**BARREIRAS SANITÁRIAS**				
		Alojamento	**Desinfeção Esterilização**	**EPI**	**Corredores de acesso às salas de animais**	**Fluxo unidirecional de pessoal e materiais**
(1-a) RP	**B1 Produção** **Definido: SPF**	-Mini-isoladores em "*racks*" com ventilação *intracage*	-Autoclaves -Detergente -Virkon®) -Pass trought -UV	-Toucas -Luvas -Botas -Uniformes estéreis	Sim	Sim
(1-b) RP	**B2 Produção** **Convencional**	-Gaiolas convencionais em estantes comuns	-Autoclaves -Detergente -Virkon®	-Toucas -Luvas -Botas -Uniformes estéreis	Sim	Não
(2) RP	**B3 Experimentação** **Convencional**	-Mini-isoladores em "*racks*" com ventilação *intracage*; -Gaiolas convencionais em estantes ventiladas	-Detergente -Hipoclorito de Sódio -Lysoform® (Formaldeido associado) -Autoclaves	-Máscara -luvas -Avental -Botas -Óculos	Não	Não
(3) RP	**B4 Experimentação** **Convencional**	-Gaiolas convencionais em estantes ventiladas e estantes comuns	-Detergente -Lysoform® (Formaldeido associado)	-Máscara -Luvas -Avental -Gorro	Sim	Não
(4) RP	**B5 Experimentação** **Convencional**	-Mini-isoladores em "*racks*" com ventilação *intracage*	-Hipoclorito de Sódio -Desinfetantes (à base de pinho e amoníaco)	-Luvas variadas -Máscaras -Aventais -Botas	Sim	Não
(5) RP	**B6 Experimentação** **Convencional**	-Gaiolas convencionais em estantes comuns	-Detergente neutro	-Luvas -Máscaras -Jalecos	Não	Não
(6) RP	**B7 Experimentação** **Convencional**	-Mini-isoladores em "*racks*" com ventilação *intracage;* -Gaiolas convencionais em estantes ventiladas	-Hipoclorito de sódio -Detergente enzimático -Lavagem ultrassônica -Flambador para gaiolas	-Luvas -Máscaras -Aventais -Botas -Gorro	Sim	Não

Quadro 1- Informações sobre algumas das barreiras sanitárias adotadas pelos biotérios USP (*campi* São Paulo e Ribeirão Preto) (continuação)

(7-a) RP	**B8 Experimentação** **Convencional**	-Gaiolas convencionais em estantes comuns.	-Hipoclorito de sódio -Desinfetante (quaternário de amônio) -Autoclaves -Tanque de passagem; -Air locks	-Luvas -Máscaras -Botas -Uniformes -Avental -Botas (borrachas)	Sim	Sim
(7-b) RP	**B9 Produção Experimentação** **Definido: SPF**	-Mini-isoladores em "*racks*" com ventilação *intracage*; -Estantes ventiladas	-Hipoclorito de sódio -Desinfetante (quaternário de amônio) -Autoclaves -Tanque de passagem; -Air locks	-Luvas -Máscaras -Uniformes -Avental -Botas (borracha)	Sim	Sim
(8) RP	**B10 Experimentação** **Convencional**	-Mini-isoladores em "racks" com ventilação intracage; -Gaiolas convencionais em estantes comuns.	-Detergente -Hipoclorito de Sódio -Autoclaves	-Luvas -Máscara -Jaleco	Sim	Não
(9) RP	**B11 Produção Experimentação** **Convencional**	Não informou	Autoclaves	Não informou	Não	Não
(10) SP	**B12 Produção Experimentação** **Definido: SPF**	-Mini-isoladores em "*racks*" com ventilação *intracage;*	-Detergente -Hipoclorito -Autoclaves (portas duplas) -Air locks	-Uniforme -Luvas -Toucas -Propé -Botas -Máscaras	Sim	Sim
(11) SP	**B13 Experimentação** **Convencional**	-Mini-isoladores em "*racks*" com ventilação *intracage;*	-Hipoclorito	-Luvas -Propé -Touca -Jaleco -Trabalho em fluxo laminar	Não	Não

4.3.1. Desinfecção e esterilização

A esterilização elimina todos os microrganismos viáveis, inclusive esporos, enquanto a desinfecção tem como objetivo matar a maioria dos microrganismos vegetativos, sem que seu efeito alcance os esporos de bactérias mais resistentes. A desinfecção e esterilização são aplicadas em itens como gaiolas, água, cama, ração e outros equipamentos utilizados nas instalações dos biotérios (CCAC, 2003).

De acordo com o *Guide for the care and use of laboratory animals* (2011): "A frequência e intensidade da limpeza e desinfecção tem relação direta com um ambiente saudável para os animais".

As discussões sobre a atividade germicida de desinfetantes químicos geralmente se referem à morte celular e inativação do micróbio. Modos de ação de germicidas são geralmente baseados em observações de rompimento celular, tais como danos de membrana, após o contato com o germicida químico (AMY INGRAHAM *et al*, 2013). O Quadro 2 apresenta alguns dos principais desinfetantes utilizados em biotérios.

Quadro 2- Comparação entre diferentes desinfetantes.

Desinfetantes	**Uso**	**Modo de ação**	**Vantagens**	**Desvantagens**
Iodo	Bactericida Virucida Fungicida	Desnaturante de proteínas celulares.	Largo espectro.	Corrosivo; Mancha; Requer longo tempo de contato; Exige diluição; Alta concentração de proteínas reduz efetividade.
Fenol	Bactericida Virucida Fungicida Tuberculicida	Veneno protoplásmico; Quebra a parede celular.	Rápida ação.	Odor; Fatal para gatos.

Quadro 2- Comparação entre diferentes desinfetantes (Continuação).

Compostos de cloro	Bactericida Fungicida Esporocida	Libera ácido hipocloroso na dose de 50 a 5000 ppm; Reativo com células.	Produto barato; Alta penetração; Rápida ação germicida.	Rapidamente inativado no solo; Carcinogênicos; Não tuberculicidas; Corrosivo em altas doses.
Quaternário de amônio	Bactericida Virucida Fungicida	Desnatura as proteínas; Afeta a membrana celular; Permeabilidade.	Destrói vírus não-envelopados; Usado diluído em pH neutro.	Não tuberculicidas. Não esporocida Não tem ação virucida hidrofílico
Dióxido de Cloro	Esterilizante	Oxidante forte; Reage com aminoácidos.	Biocida ideal; Ação rápida; Agressivo; Reativo.	Corrosivo; Requer mistura no local; Curto tempo de armazenamento.
Peroximonosulfato de potássio	Bactericida Virucida Fungicida	Oxidante.	Reativo; Múltiplos mecanismos de morte celular; Agressivo; Rápida ação.	Curto tempo de armazenamento; O pó é corrosivo.

Fonte: Adaptado de Amy Ingraham *et al* (2013).

O método de esterilização de preferência é o calor úmido sob alta pressão e temperatura (em autoclave) para os materiais termoresistentes. Para os materiais termolábeis pode ser utilizado o gás de óxido de etileno. Substâncias químicas de esterilização a frio também podem ser utilizados de forma eficaz para muitos materiais que não suportam calor, assim como, glutaraldeído a 2% por 10 horas, formaldeído a 8% e álcool a 70% por 18 horas, além do peróxido de hidrogênio a 6% por 6 horas (tempos mínimos) (DUKE UNIVERSITY AND MEDICAL CENTER, 2001).

Em nosso estudo observou-se a utilização de autoclaves como método físico em 61% (n=8) dos biotérios; lavagem ultrassônica 7,7% (n=1); UV 7,7% (n=1) e flambadores para esterilização de gaiolas de coelhos 7,7% (n=1). Os produtos químicos utilizados foram: hipoclorito de sódio 61% (n=8), detergentes 46% (n=6), formaldeído

associado lysoform 15% (n=2), Virkon® (peroximonosulfato de potássio) 15% (n=2), desinfetante quaternário de amônio 7,7% (n=1), desinfetante à base de pinho e amoníaco 7,7% (n=1) e detergente enzimático (desinfetante compostos por enzimas, surfactantes e solubilizantes) 7,7% (n=1).

A maioria dos biotérios apresentaram combinações eficientes de métodos de esterilização física e química. O B 11 apontou para a utilização de autoclaves para esterilização, mas não informou os produtos utilizados para desinfecção do ambiente e de materiais que não podem ser submetidos às autoclaves.

Apenas o B6 se mostrou deficiente e incompleto na aplicação dos métodos, pois não utiliza método de esterilização física e para desinfecção utiliza apenas detergente neutro, apresentando, portanto, uma desinfecção deficiente. De acordo com Jorge e Castro (2000), sempre que possível deve-se autoclavar as gaiolas a 121°C por 30 min. Quando esse procedimento não for possível, as gaiolas devem ser limpas com detergente neutro e imersas em solução desinfetante à base de amônia quaternária ou iodo.

4.3.2. Equipamentos de Proteção Individual (EPI)

Os princípios básicos que regem sobre a seleção de materiais de proteção individual em biotérios são: 1) Proteção pessoal contra danos, tais como, alérgenos, doenças infecciosa/zoonóticas e risco físico (por exemplo, mordidas, ruído, riscos de queimaduras químicas, etc); 2) Proteção dos animais contra a introdução de doenças. É essencial que se reconheça as variedades de fatores, (por exemplo, o estado de doença do animal, imunocompetência, atividades que incluam a utilização de produtos químicos ou radiação, fatores físicos perigosos, tais como o modo de funcionamentos e instalações dos biotérios, etc) que podem influenciar na seleção adequada dos EPIs. Portanto é importante que o biotério conte com programa de segurança e saúde ocupacional adequado e específico para cada biotério (OACU - Office of Animal Care and Use, 2013).

A maioria dos biotérios participantes, com exceção de um que não informou sobre os EPIs utilizados, apresentou combinações pertinentes para o padrão sanitário convencional. No caso dos biotérios que mantém animais SPF a combinação de EPIs se mostrou mais completa e satisfatória. Dentre os equipamentos utilizados foram citados:

jaleco, uniforme esterilizado, avental, luvas, gorros, propé, botas de borracha e máscaras.

De acordo com Institutional Animal Care and Use Committee - ACUP (2014), alguns dos equipamentos que devem ser utilizados por bioteristas e usuários de biotérios são: roupas de proteção externa, tais como, jalecos de pano (uso exclusivo no biotério), jalecos descartáveis e macacão *tyvek*; luvas de espessura e material apropriados; máscaras e respiradores (variáveis de acordo com risco) para proteção da mucosa respiratória; óculos ou protetor facial contra respingos, para proteção dos olhos e da face; proteção dos pés (propé ou botas), para evitar contaminação cruzada veiculada pela sola dos sapatos; e proteção auricular, com a utilização, por exemplo, de tampões de ouvido (Figura 10).

Figura 10 – Exemplo de alguns dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI) que devem ser utilizados nos biotérios. Fonte: adaptado de Institutional Animal Care and Use Committee (2014).

4.3.3. Alojamentos

O alojamento dos animais deve ser criteriosamente definido para evitar lesões aos animais, promover conforto físico, facilitar manutenção, saneamento e principalmente estar adequado ao status sanitário em que o animal deve ser mantido.

A utilização de alojamentos baseado em mini-isoladores em "*racks*" com ventilação *intracage* (ICV), promovem melhoria nas condições atmosféricas microambientais e na saúde dos animais. As gaiolas comuns em estante aberta ou em estantes ventiladas promovem ventilação geral diluidora (VGD). As estantes abertas fazem trocas de ar com toda a sala, aumentando as chances de contaminação e climatização ineficiente, enquanto que as estantes ventiladas, conhecida como ventilação geral diluidora semi-direcional (VGD-SD), trocam ar apenas com os animais alojados na mesma estante, além de possibilitar um controle adequado das condições climáticas das gaiolas e números de trocas de ar. Porém são mais ineficientes que os alojamentos ICV, pois arrastam os gases e umidade presentes apenas na parte superior das caixas após sua suspensão (CARISSIMI *et al*, 2000; REEB-WHITAKER *et al*, 2001; TEIXEIRA *et al*, 2006).

Dentre os biotérios analisados houve a prevalência por modelos de alojamentos baseados em mini-isoladores em "*racks*" com ventilação *intracage* (ICV), gaiolas convencionais em estantes ventiladas (VGD) e gaiolas convencionais em estantes comuns (VGD) (Figura 11). Sendo recorrente a utilização de mais de um modelo de alojamento (Gráfico 3).

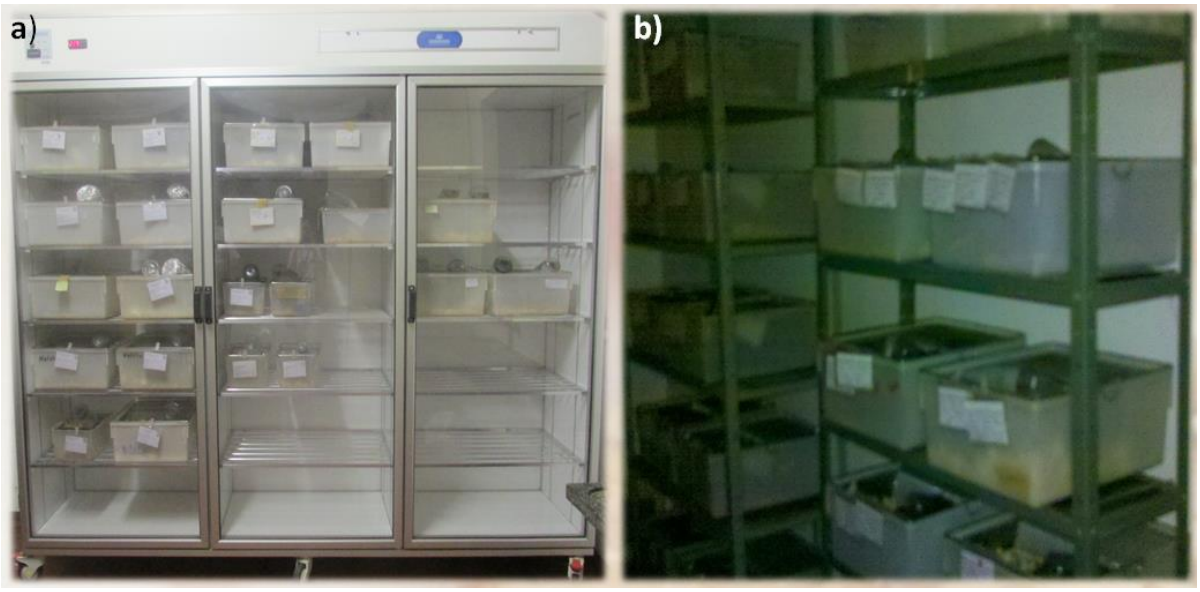
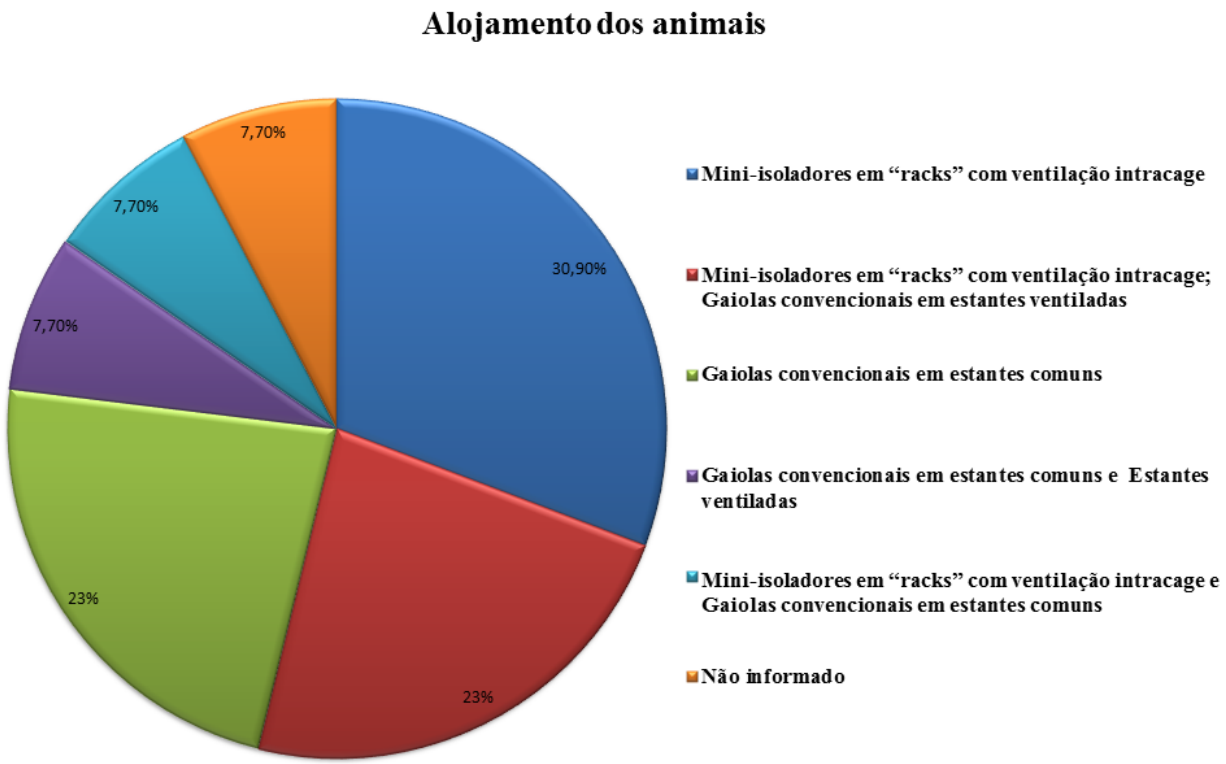


Figura 11. a) Gaiolas comuns em estante ventilada. b) Gaiolas comuns em estante convencional. Ambos os modelos são utilizados por biotérios participantes da pesquisa. A fotografia foi feita pelo pesquisador sob autorização do docente responsável.

Gráfico 3- Prevalência de modelos de alojamento



De acordo com Teixeira *et al* (2006) o método de ventilação dos alojamentos está diretamente relacionado com a saúde dos animais. Os animais mantidos sob VGD são constantemente expostos a altos níveis de poluentes presentes no ambiente (poeira, bactérias no ar, etc), além de poluentes resultantes do metabolismo do animal (por exemplo, amônia e dióxido de carbono) de dentro das gaiolas. Os pesquisadores concluíram ao expor animais a (VGD-SD), que essa modalidade de ventilação pode ocasionar efeitos deletérios ao epitélio ciliado das vias aéreas, sendo esse efeito evitado com a utilização do sistema ICV.

De acordo com Martinewski *et al* (2013) a VGD pode ocasionar ineficiência geral dos parâmetros ambientais, afetando diretamente as condições sanitárias e fisiológicas dos animais. Os pesquisadores demonstraram que os animais mantidos em condições convencionais sob VGD apresentaram consideráveis alterações histológica no pulmão (pneumonia intersticial, reação inflamatória discreta e hemorragia).

4.3.4. Corredores

A existência de corredores de acesso à sala dos animais representa um importante ponto para o funcionamento operacional e sanitário do biotério. De acordo com CCAC (2003) os corredores representam um componente importante para o funcionamento de biotérios, pois facilitam a movimentação de pessoas, animais, objetos e equipamentos. Mas para que se possa evitar risco de contaminações cruzada é necessário desenvolver conceitos de movimentação funcional entre as áreas. De modo geral, a lógica se baseia em uma movimentação progressiva entre as áreas limpas (menor potencial de contaminação microbiana) para as áreas mais sujas (maior potencial de contaminação microbiana). Este princípio aplica-se para o movimento de pessoas, equipamentos, materiais, alimentos e também para a circulação de ar.

Existem dois padrões básicos de corredores de circulação: corredores simples e corredores duplos. Corredores duplos também são conhecidos como corredores ”limpo-sujos”. O objetivo do padrão de circulação dos corredores duplos é o de diminuir o potencial de contaminação cruzada entres as salas de apoio e as salas dos animais. Em teoria os corredores duplos são mais eficientes em reduzir a contaminação cruzada do que os corredores simples. Uma desvantagem do corredor duplo está relacionada à grande demanda por áreas. Se a área disponível não representar um problema ao biotério, então os corredores duplos representam a melhor opção. Porém muitas instalações com um único corredor munido de barreiras sanitárias adequadas podem funcionar de maneira eficiente no controle de contaminações (Figura 12) (HAU; HOOSIER Jr., 2003).

Nos biotérios analisados 31% (n=4) não possuem tais corredores, expondo, desse modo, as salas dos animais às áreas de circulação externa. Esse tipo de funcionamento pode ocasionar comprometimentos ao biotério em termos de gerenciamento de fluxo, isolamento dos animais e contaminação cruzada. Dos biotérios que possuem corredores 69% (n=9), apenas 44% (n=4) utilizam o padrão unidirecional de passagem de materiais, o que permite o gerenciamento do fluxo de materiais limpos e sujos (Quadro 1).

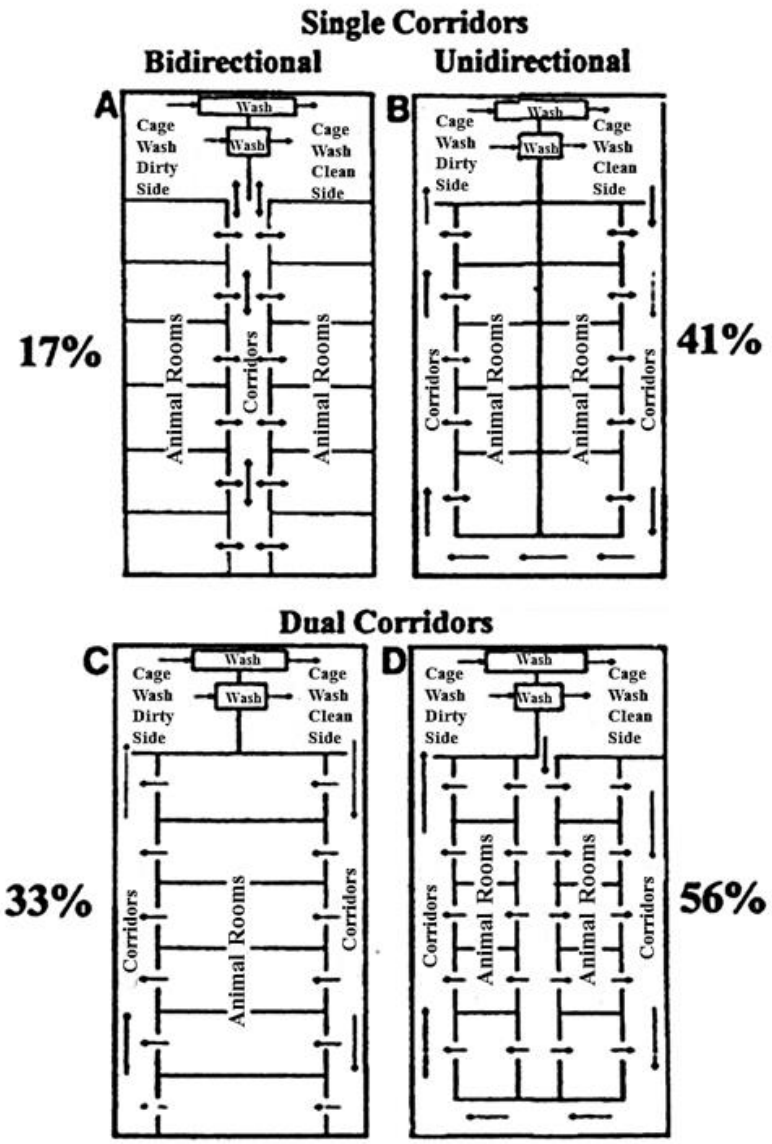


Figura 12 – Esquema apresentando quatro padrões básico de circulação em biotérios via corredores. A- Ilustra um corredor único central padrão bidirecional. B- Ilustra um corredor único periférico padrão unidirecional. C- ilustra corredores duplos com padrão maior para as salas dos animais. D- ilustra corredores duplos com padrão menor de tamanhos para as salas dos animais. Todas as ilustrações apresentam a mesma área, variando a porcentagem referente ao tamanho dos corredores, padrão (unidirecional ou bidirecional) e tamanho das salas dos animais. As porcentagens apresentadas servem para ilustrar diferentes combinações de padrões de circulação em relação ao tamanho dos alojamentos dos animais, e não se aplicam necessariamente a um plano específico de construção (HESSLER; HÖGLUND, 2003).

4.3.5. Climatização

A climatização em biotérios é responsável por fornecer ar puro em temperatura e umidade específicas para os animais alojados nas salas. É comum em biotérios a tentativa de se controlar esses parâmetros no macroambiente, mas as atenções devem ser voltadas para o microambiente, onde os animais estão alojados. A qualidade do ar nos biotérios sofre grande influência por características como: localização do biotério e das gaiolas no interior das salas, distribuição do ar na sala, design da gaiola, conformação das prateleiras ou estantes, espécies alojadas, material de cama, entre outros (CCAC, 2003). O Quadro 3 apresenta informações sobre os métodos utilizados pelos biotérios analisados para realizar a climatização.

Quadro 3 – Informações sobre os sistemas de climatização dos biotérios da USP (*Campi* Ribeirão preto e São Paulo).

Biotérios Padrão Sanitário		**Ventilação**	**Controle da temperatura (T°C)**	**Controle da umidade relativa do ar (URar)**
(1-a) RP	B1 Produção Definido: SPF	-Sistema de exaustão e ventilação com filtros no macroambiente e no microambiente por micro-isoladores; -Utilização de filtros HEPA; -Número de trocas de ar desconhecido.	Ar condicionado microambiente	Ar condicionado microambiente
(1-b) RP	B2 Produção Convencional	-Sistema de exaustão e ventilação no macroambiente; -Utilização de filtros; -Número de trocas de ar desconhecido.	Ar condicionado macroambiente	Ar condicionado macroambiente
(2) RP	B3 Experimentação Convencional	-Sistema de ventilação controlado no microambiente por estantes ventiladas e micro-isoladores. -Utilização de filtros; -Número de trocas de ar desconhecido.	Ar condicionado no microambiente	Não informado
(3) RP	B4 Experimentação Convencional	- Sistema de ventilação e exaustão controlado no macroambiente e no microambiente estantes ventiladas; -Utilização de filtros; -Número de trocas de ar desconhecido.	Ar condicionado Microambiente	Não informado

Quadro 3 – Informações sobre os sistemas de climatização dos biotérios da USP (*Campi* Ribeirão preto e São Paulo) (continuação).

(4) RP	B5 Experimentação Convencional	-Sistema de ventilação controlado no microambiente por micro-isoladores; -Utilização de filtros; -Número de trocas de ar desconhecido.	Ar condicionado Microambiente	Ar condicionado Microambiente
(5) RP	B6 Experimentação Convencional	-Sistema de ventilação no macroambiente; -O exaustor permanece 15 min ligado e 15 min desligado sem filtração.	Ar condicionado no macroambiente em 23ºC	Não é realizado
(6) RP	B7 Experimentação Convencional	-Sistema de ventilação controlado no microambiente por estantes ventiladas e micro-isoladores; -Trocas do ar/ hora variando de 27,3 a 56,9 sem filtração.	Ar condicionado no macroambiente e microambiente. Temperatura em 23,5 a 24,5ºC	Não é realizado
(7-a) RP	B8 Produção Convencional	-Sistema de ventilação no macroambiente. -20 trocas de ar/h sem filtração.	Ar condicionado no macroambiente	Ar condicionado tipo Split
(7-b) RP	B9 Produção Experimentação Definido: SPF	-Sistema de ventilação controlado no microambiente por estantes ventiladas e micro-isoladores; -40 trocas de ar por hora com filtros HEPA.	Ar condicionado microambiente	Ar condicionado microambiente
(8) RP	B10 Experimentação Convencional	-Sistema de ventilação e exaustão controlado no macroambiente e no microambiente por micro-isoladores; -Utilização de filtros; -Número de trocas de ar desconhecido.	Ar condicionado no macroambiente	Não é realizado
(9) RP	B11 Produção Experimentação Convencional	Não informado	Ar condicionado no macroambiente e microambiente.	Utilização de Ar condicionado e Higrômetro no macroambiente e no microambiente
(10) SP	B12 Produção Experimentação Definido: SPF	-Sistema de ventilação controlado no microambiente por micro-isoladores; -De 15 a 20 trocas/horas com filtros HEPA	Ar condicionado no macroambiente e microambiente.	Ar condicionado no macroambiente e microambiente
(11) SP	B13 Experimentação Convencional	-Sistema de ventilação controlado no microambiente por micro-isoladores; -Utilização de filtros; -Número de trocas de ar desconhecido.	Ar condicionado no macroambiente e microambiente.	Ar condicionado no macroambiente e microambiente

Nos biotérios analisados observa-se que a maioria (B1, B3, B5, B7, B9, B12 e B13) possui a ventilação e exaustão controlados no microambiente por meio de alojamentos que possuem esses sistemas acoplados, caso das estantes ventiladas e dos micro-isoladores. Esses tipos de alojamentos proporcionam um controle direcionado e eficiente, pois diminuem o módulo de controle ambiental (estantes ventiladas ou micro-isoladores).

No caso dos B2, B6 e B8 a ventilação e exaustão são controlados no macroambiente, pois utilizam sistemas de alojamentos abertos, mas no B6 o sistema de exaustão possui funcionamento alternado (ligado de 15 em 15 minutos), apresentando, portanto, deficiência na ventilação e exaustão. Quando os alojamentos são abertos é necessário um controle rigoroso de toda a sala, pois a unidade ambiental se torna a própria sala. Quando esse controle não é alcançado o microambiente dos animais pode apresentar sérios problemas climáticos. Outros biotérios (B4 e B10) possuem sistema misto com alguns animais em alojamentos controlados e outros expostos ao macroambiente.

Apenas nos biotérios B6, B7 e B8 não são utilizados filtros. A utilização de filtros de alta eficiência (HEPA) foi prevista apenas nos biotérios SPF (B1, B9 e B12). A utilização de filtro é importante em todos os tipos de alojamento, principalmente nos alojamentos abertos, onde é essencial que se mantenha a ventilação e exaustão do ar constantemente filtrado em quantidades compatíveis com a renovação completa do ar de toda a sala.

De acordo com Jorge e Castro (2000), a ventilação dentro do ambiente dos biotérios deve ser adequada para a renovação regular do ar, trocas de calor e de produtos da respiração dos animais, remoção de poluentes, diluição de odores (principalmente a amônia) e dispersão das partículas bacterianas. É recomendável que o ar penetre e saia por filtros, para que seja limpo, sem impurezas, poeiras e contaminantes.

De acordo com o *Canadian Council on Animal Care* (2003) os biotérios devem prover um aporte de ar com boa qualidade, portanto o estabelecimento deve contar com um sistema de exaustão, para impedir a recirculação do ar no interior das salas ou gaiolas. O ar fresco deve passar por filtros para remoção das partículas maiores de poluentes, e em caso de biotérios SPF, os filtros devem ser absolutos (HEPA), como constatado nos biotérios SPF participantes.

O número de trocas de ar realizado nas salas ou gaiolas pode apresentar variações de acordo com a necessidade específica de cada biotério. A informação sobre

o número de trocas de ar não foi fornecida pela maioria dos biotérios. Apenas três biotérios apresentaram o número de trocas de ar por hora: B8 que realiza 20 trocas/hora, B 9 com 40 trocas/hora e o B12 de 15 a 20 trocas/hora.

O número de trocas de ar deve seguir a recomendação de 15 a 20 trocas por hora nas salas ou gaiolas. Essa recomendação não leva em consideração a eficiência da distribuição do ar, nem o número de animais que estão alojados no mesmo recinto. De modo geral, essa recomendação pode ser eficaz para a grande parte dos animais alojados em alojamentos convencionais, mas a recomendação pode ser maior se os animais estiverem alojados em gaiolas "*topfilter*", ou menor se os animais estiverem em unidades de ventilação individual (MEMARZADEH, 1998; CCAC, 2003; CHOW *et al* 2008).

De acordo com o *Guide for the care and use of laboratory animals* (2011) para o bem estar de organismos homeotérmicos é importante que a regulação da temperatura corporal dos animais esteja dentro das variações normais. De modo geral, a exposição de animais a temperaturas acima de 29,4ºC (85ºF) ou abaixo de 4,4 ºC (40º F), sem acesso a locais de abrigo ou mecanismos de proteção, resultará em comprometimento da saúde, podendo colocar o animal em risco de morte. Os animais podem suportar situações de clima extremo por meio de compensações fisiológicas, mas essa "adaptação" leva tempo e pode alterar o desempenho dos animais e consequentemente os resultados de protocolos bem estabelecidos.

A temperatura em todos os biotérios participantes é controlada por meio de ar condicionado instalado no macroambiente, ou seja, nas salas dos animais e ou no microambiente acoplados aos alojamentos de climatização controlada (micro-isoladores e estantes ventiladas). O valor da temperatura apenas foi informado em dois biotérios (B6 e B7) e se manteve no intervalo de 23 a 24ºC. A umidade relativa dos alojamentos também é controlada por meio de ar condicionado em sete biotérios (B1, B2, B5, B8, B9, B12, B13). Em B6, B7 e B10 não existe qualquer método de controle da umidade, prevalecendo a umidade natural da sala. No caso dos B3 e B4 essa informação não foi fornecida (Quadro 3).

O ar condicionado é considerado um meio eficaz de regulação da temperatura e umidade, pois impede variações abruptas desses parâmetros. Para ratos e camundongos o intervalo ótimo de temperatura é de 18-26 ° C (64-79ºF). A umidade relativa nas salas dos animais deve ser mantida entre 40% e 60%, dependendo da espécie, e controlado a ± 5%. A regulação da temperatura e da umidade é importante

para evitar doenças, como por exemplo, a doença “ringtail”, que ocorre principalmente em ratos jovens em baixa umidade e alta temperatura. O excesso de calor e umidade podem causar insolação e indiretamente ocasionar doença respiratória crônica, por descompensação fisiológica, resultando em morte (CCAC, 2003; DONNELLY, 2004; HUERKAMP, 2012).

4.3.6. Material de cama e periodicidade de troca das gaiolas

O material que compõe a cama é um item de grande importância no microambiente dos animais de laboratório. Ele é responsável por fornecer calor e isolamento térmico, absorção da umidade das excretas, conforto e substrato para nidificação (ASTON, 2010). Nos biotérios analisados, 100% apresentaram a utilização de Maravalha de *Pinus sp*. No caso dos biotérios de Ribeirão Preto, toda a maravalha é proveniente de uma estação própria de produção situada no biotério central (inaugurada em 2014), o que viabiliza o controle da qualidade e procedência.

De acordo com *o Guide for the care and use of laboratory animals* (2011) a maravalha de *Pinus sp* representa uma opção segura para a cobertura do piso de gaiolas, sendo amplamente utilizada pelos biotérios. Porém a confecção da maravalha proveniente do processamento de madeira verde, na grande maioria dos casos, possui substancias aromáticas que pode induzir a produção de enzimas hepáticas microssomais em ratos e camundongos, podendo interferir em estudos toxicológicos. Além disso, a madeira pode conter substâncias químicas como inseticidas e fungicidas (agrotóxicos), que afetam o animal, comprometendo o seu sistema imune (VESELL ES, 1967; ANDRADE *et al*., 2002; BURN; MASON, 2005).

A maravalha deve ser tratada na própria linha de produção, para garantir que o produto não tenha contaminação por agrotóxicos, produtos químicos, matéria orgânica de origem animal entre outros. Antes de ser utilizada deve passar pelo processo de esterilização por autoclaves e armazenada em ambiente adequado e separados de outros produtos, como por exemplo, em recintos distintos dos que são armazenados os alimentos e animais, devido à facilidade de deterioração, decomposição e contaminação da maravalha (ANDRADE *et al*, 2002). Todos esses procedimentos de cuidado na confecção da maravalha são adotados pela fabrica de maravalha do biotério central de Ribeirão Preto, que é responsável pelo fornecimento do material para todos os biotérios

do campus. Informações sobre a origem da maravalha dos dois biotérios de São Paulo não foram fornecidas.

De acordo com *o Guide for the care and use of laboratory animals* (2011) as trocas de cama das gaiolas devem ser feitas em quantidades suficientes para manter os animais limpos e secos. A frequência da troca deve levar em consideração o julgamento do profissional responsável pelos cuidados com os animais, que deve se basear em fatores como o número e tamanho dos animais, o tipo de alojamento, débito urinário e fecal, aparência e excesso de umidade da cama, e as condições experimentais, como por exemplo, debilitações advindas da recuperação pós-cirúrgicas, que podem limitar a movimentação dos animais ou acesso a áreas da gaiola que não estão sujas com urina e fezes. Não existe uma frequência mínima estabelecida para as trocas de camas, mas tipicamente variam de diária a semanalmente.

Nos biotérios analisados a periodicidade de trocas das camas apresentou uma variação de 1 a 7 vezes por semana, em geral a troca é feita 3 vezes por semana. No caso do B3 a necessidade de trocas diárias é empregada para coelhos e no caso dos B9 e B10 as trocas possuem uma periodicidade de 4 vezes por semana devido à condição diabética dos ratos e consequente aumento do débito urinário (Tabela 4).

Tabela 4- Periodicidade de troca das camas dos biotérios participantes.

Biotérios	**Trocas de cama/semana**
B1	1 a 2
B2	1 a 3
B3	3 a 7(*)
B4	3
B5	2 a 3
B6	3
B7	3
B8	3
B9	2 a 4(**)
B10	2 a 4(**)
B11	3
B12	2
B13	3

(*) Coelhos

(**) Ratos diabéticos

De acordo com Andrade *et al.* (2002), a quantidade para troca de gaiolas e bandejas devem ser a cada dois dias (três trocas por semana) e todo material sujo deve ser trocado por itens esterilizados e desinfetados.

O tipo de alojamento utilizado influencia diretamente sobre a periodicidade das trocas das camas e saúde dos animais. De acordo com Nahas (2002) foi comprovado que a concentração de amônia nos sistemas que utilizam micro-isoladores é menor que a de sistemas convencionais, mesmo com maiores intervalos de troca de cama.

De acordo com Rosenbaum *et al.* (2010) a frequência de trocas das gaiolas possui implicações importantes para os animais e para as pessoas envolvidas diretamente com esse cuidado. Os roedores, por possuírem sua natureza orientada pelo olfato, principalmente por feromônios, podem desenvolver quadros de estresse com o excesso de trocas. A utilização de gaiolas com ventilação individual (IVC) possibilita um período prolongado de trocas das camas. Segundo os pesquisadores a mudança das camas após catorze dias em alojamentos IVC (com cinco camundongos fêmeas por gaiola com um número de trocas de ar adequado) se mostrou apropriado com relação às condições ambientais (umidade, fezes, urina e vapores de amônia) e sem interferências no bem-estar dos animais.

4.4. Fotoperíodo

O fotoperíodo é um regulador crítico para o comportamento reprodutivo de muitas espécies de animais, podendo ocasionar distúrbios fisiológicos e comportamentais. Interrupções eventuais no ciclo claro/escuro devem ser eliminadas para não enviesar a fase de escuridão, comprometendo assim, o bem estar dos animais. Como medidas preventivas a essas interferências, as salas dos animais não devem possuir janelas ou frestas que possam projetar iluminação acessória, e o tempo de cada ciclo deve ser controlado com o auxílio de temporizadores (*Guide for the care and use of laboratory animals*, 2011).

Nos biotérios analisados a adoção de ciclo claro/escuro de 12h/12h, sendo a iluminação proveniente de luz fluorescente foi relatado em 100% dos casos. De acordo com o *Canadian Council on Animal Care* (2003) a maioria das espécies utilizadas em laboratórios respondem bem ao ciclo claro/escuro de 12h/12h. Ratos e camundongos apresentam adequada performance sob o ciclo de 14horas de luz e 10 de escuro. A

iluminação fluorescente, luz emitida por cargas elétricas em vapor ionizado, é a que mais se aproxima, em relação à luz incandescente, do espectro da luz solar. Esse tipo de iluminação é biologicamente balanceado e contém comprimentos de onda mais curtos da luz ultravioleta.

4.5. Enriquecimento Ambiental

O principal objetivo do Enriquecimento Ambiental (EA) é o de aumentar o bem-estar (físico e psicológico) dos animais, por meio do oferecimento de recursos que permitam a estimulação sensorial e facilitem as expressões comportamentais específicas da espécie. O impacto ou viés do EA nas pesquisas são sempre questionados e avaliados. Entretanto, os benefícios globais do enriquecimento estão sendo reconhecidos em uma escala maior do que as pesquisas contrárias. Tradicionalmente os pesquisadores da área e veterinários tem se incumbido de demonstrar que os experimentos não terão impactos se houver a adoção de técnicas de EA. Mas no presente momento essa tendência está mudando e os cientistas estão sendo convidados a demonstrarem porque as técnicas de EA estão sendo excluídas do experimento (*Guide for the care and use of laboratory animals*, 2011).

De acordo com Reinhardt e Reinhardt (2006), mudanças nos paradigmas tradicionais das condições de habitação dos animais confinados, por meio de técnicas que melhorem o ambiente dos mesmos, podem conferir bem-estar geral. O bem-estar é um estado subjetivo de contentamento. Esse estado é alcançado quando as necessidades básicas para a saúde física, comportamental e conforto são cumpridas.

Com base na premissa de que os aspectos estruturais de um sistema ambiental possam influenciar na fisiologia e comportamento dos animais que ocupam esse sistema, os pesquisadores Belz *et al* (2003) procuraram examinar os efeitos fisiológicos do enriquecimento ambiental em ratos *Sprague–Dawley* de ambos os sexos, por meio da dosagem de hormônios do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), hormônios responsáveis pela respostas ao estresse. No experimento dois tipos de ambientes foram usados. Um grupo de animais ficou em uma gaiola em condições laboratoriais padrão. O segundo grupo ficou em gaiolas enriquecidas com brinquedos KONG® e material de nidificação Nestlets®. Ambos os grupos foram submetidos a um estímulo de estresse (injeção de solução salina). Os autores verificaram que os animais de ambos os sexos alojados com EA apresentaram baixos níveis dos hormônios adrenocorticotrófico

(ACTH) e corticosterona (CORT) (libertados a partir da pituitária anterior e do córtex supra-renal, respectivamente) em relação ao animais alojados sem EA. Os autores concluíram que os elementos de enriquecimento forneceram aos ratos condições de vida menos monótonas, resultando em menor atividade do eixo HPA antes e após o estresse. Esses resultados são importantes porque níveis baixos e estáveis desses hormônios são essenciais para o discernimento farmacológico preciso e outras influencias no eixo HPA.

O EA tem sido pesquisado e correlacionado também com a diminuição da ansiedade e resistência imunológica. Os pesquisadores Benaroya-Milshtein *et al* (2004) investigaram o efeito do EA em relação a imunidade e emotividade. A investigação se baseou no efeito do EA sobre a atividade natural das células natural killer (NK), e as respostas ao estresse psicológico e parâmetros comportamentais em camundongos C3H (machos), mantidos em alojamentos enriquecido e sem enriquecimento por 6 semanas. Os autores concluíram que os camundongos expostos ao EA apresentaram diminuição da ansiedade e maior atividade em comparação ao grupo de animais sem enriquecimento. Além disso, a atividade das células NK no baço dos animais submetidos ao EA foi maior. Portanto o EA apresentou um efeito benéfico sobre a ansiedade, resposta ao estresse e maior atividade das células NK. O efeito sobre a atividade das células NK é promissor, devido ao papel que essas células possuem na resistência imunológica do hospedeiro.

O papel do EA sobre a ansiedade também foi investigado pelos pesquisadores Sztainberg e Chen (2010) que em seus estudos propuseram, de forma detalhada, um protocolo simples de EA para testar o efeito ansiolítico em 12 fêmeas de camundongos C57BL/6J. Os autores validaram o protocolo confirmando que animais alojados em condições enriquecidas apresentam redução dos níveis de ansiedade.

De acordo com Würbel (2007) a adoção de técnicas de EA pode impedir a expressão de comportamento anormal (estereotipias), além de trazer bem estar aos animais. Mas existem preocupações relacionadas com a possibilidade de que as práticas com EA possam alterar a padronização dos experimentos. Para estudar esta possibilidade, os pesquisadores utilizaram um sistema de repetição multi-laboratorial, que envolveu nove repetições independentes (três em cada um dos três laboratórios) com o objetivo de estudar os efeitos do enriquecimento versus a habitação estéril. Foram utilizamos camundongos de duas linhagens (C57BL/6J, DBA/2) e sua F1-híbridos (B6D2F1). Cada repetição envolveu 8 camundongos por linhagem em

condições distintas de alojamento, totalizando 48 animais por replicação e 432 camundongos no total. Com 10 semanas de idade, todos os animais foram submetidos a 4 testes ambientais comumente empregados para o estudo de drogas e comportamento fenotípico de camundongos mutantes. Os pesquisadores demonstraram que o enriquecimento do ambiente pode ser utilizado para melhorar o bem-estar dos animais, sem redução da precisão e reprodutibilidade dos dados, além de atenuar comportamentos atípicos provenientes do estresse do encarceramento e ansiedade.

Os pesquisadores Simpson e Kelly (2011) realizaram um levantamento bibliográfico incluindo 361 artigos sobre enriquecimento ambiental publicado no período de 1960 a 2009 na base de dados do Pubmed. Os pesquisadores observaram que a grande maioria dos animais no pós-desmame alojados em gaiolas com enriquecimento ambiental por um intervalo de 4 a 8 semanas (período e idade adotados como padrão para a observação de efeitos neuroquímicos e comportamentais) foram protegidos contra o desenvolvimento de comportamentos estereotipados desencadeado pela privação ambiental. A literatura indica que os ratos e outros roedores alojados em condições padrão possuem maiores chances de desenvolver distúrbios mentais devido à privação sensorial e motora; estereotipias, provenientes da sensação de frustação crônica ao tentar obter acesso a recursos altamente valorizados (como por exemplo, os locais de abrigo e material para confecção de ninhos); e exibem perfil comportamental ansiogênico em comparação com animais de ambiente enriquecido. Por esse motivo, os pesquisadores devem olhar para os laboratórios com o objetivo de refinar as condições de habitação dos animais e incluir elementos que estimulem as interações e comportamentos específicos da espécie. Os autores enfatizam que o enriquecimento ambiental foi aceito como parte vital da criação de animais em zoológico e esperam que em um futuro próximo esse benefício, após a validação adequada, seja estendido a todos os laboratórios de pesquisa.

No presente estudo verificamos que 61% (n=8) dos biotérios não adotam nenhuma técnica de enriquecimento ambiental. Os demais biotérios adotam as práticas, mas essas são caracterizadas, em sua maioria, como esporádicas. As respostas fornecidas pelos biotérios que adotam técnicas de EA foram:

> "Alguns usuários adotam, porém a minoria. Ex. globos, cilindros e máscara cirúrgica" (sic B5)
>
> "As vezes, conforme a vontade do pesquisador." (sic B4)

"Sim, dependendo dos pesquisadores e linhas de pesquisa. São usados tubos de PVC, iglus e papel picado em tiras" (sic B7)

"sim, iglus, canos de papel e algodão" (sic B13)

"Não é regra. Quando utilizado por algum pesquisador emprega-se tubo de papel higiênico e papel higiênico picado" (sic B14).

Apesar de o enriquecimento ambiental ser comprovadamente benéfico aos animais, propiciando ambientes mais estimulantes, diminuição do stress, ansiedade e bem-estar global, essa prática se mostrou pouco difundida nos biotérios analisados, e esteve limitada à vontade e interesse dos escassos pesquisadores que aderem ao EA.

4.6. Presença do veterinário como responsável técnico

A atuação do veterinário é essencial para a elaboração de programas que envolvam experimentos com animais. O foco do veterinário é o cuidado com a saúde animal, fiscalizar seu bem-estar e realizar procedimentos clínicos nos animais utilizados em pesquisas, testes, ensino e produção. Essa responsabilidade se estende durante todas as fases dos experimentos e vida dos animais. O médico veterinário deve fornecer orientações para os pesquisadores e todos os envolvidos nos cuidados com os animais, no sentido de garantir boas práticas com a manipulação, tratamento médico adequado, imobilização, sedação, analgesia, anestesia e eutanásia. Ainda, deve-se salientar o fornecimento de orientação e supervisão para programas de cirurgia e cuidados perioperatórios. (*Guide for the care and use of laboratory animals*, 2011)

No Brasil a Advocacia Geral da União (AGU) aprovou uma norma estabelecendo que os biotérios devam ter como responsável técnico um profissional com título de médico veterinário especializado em animais de laboratório. A Resolução nº06/2012 é do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), órgão colegiado vinculado ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) (PORTAL BRASIL, 2014), o qual define:

> "Art. 9º - Fica instituída a figura do Coordenador de Biotérios e do Responsável Técnico pelos Biotérios, na forma abaixo:

> I - o Coordenador de Biotério deverá ser profissional com conhecimento na ciência de animais de laboratório apto a gerir a unidade visando ao bem estar, à qualidade na produção, bem como ao adequado manejo dos animais dos biotérios;
> II - o Responsável Técnico pelos Biotérios deverá ter o título de Médico Veterinário com registro ativo no Conselho Regional de Medicina Veterinária da Unidade Federativa em que o estabelecimento esteja localizado e assistir aos animais em ações voltadas para o bem-estar e cuidados veterinários." (BRASIL, 2012).

No presente trabalho a presença do veterinário como responsável técnico nos biotérios analisados foi classificada em três grupos. O primeiro grupo inclui os biotérios que não possuem um veterinário como responsável técnico, representando 46% (n=6) do total de biotérios participantes. O segundo inclui os biotérios que possuem um veterinário, mas o profissional é compartilhado por outros biotérios, ou seja, o mesmo veterinário é responsável por até 4 biotérios distintos (informação fornecida no questionário e também pela verificação de repetições do mesmo profissional nos diferentes questionários). Essa modalidade representou um total de 31% (n=4). O terceiro grupo possui um veterinário exclusivo do biotério como responsável técnico, representando 23% (n=3) do total.

Apesar da Resolução Normativa nº 06/2012 do CONCEA estar em vigor desde sua publicação, estamos em 2015 e pudemos observar, por meio deste trabalho, que nem todos os biotérios conseguiram se adequar, mantendo o biotério sem veterinário ou apresentando o profissional com mera finalidade burocrática, devido às suas múltiplas assessorias e representações.

5. Conclusão

A Universidade de São Paulo possui Regimento Interno que estabelece responsabilidade de coordenação e gerenciamento sobre seus biotérios, além de programas de apoio financeiro e obrigatoriedade de vínculo de cada um dos biotérios cadastrados na Pró-Reitoria de Pesquisa da USP com suas respectivas Comissões de

Ética no Uso de Animais. Mas em determinados casos essas medidas não alcançam o cerne do problema, que é a cobrança e controle de instalações adequadas aos biotérios em funcionamento.

No presente estudo, que analisou as respostas de 11 questionários, pudemos constatar a existência de problemas ambientais, que podem comprometer o bem estar animal e, consequentemente, a validação dos ensaios experimentais. Tais inadequações foram informadas apenas pelos biotérios de animais com padrão sanitário convencional, enfatizando assim, a necessidade de que a equipe responsável passe a oferecer condições ambientais corretas, segundo regras mais criteriosas de instalações e funcionamento, de acordo com a legislação brasileira vigente e em conformidade com normas internacionais.

Dentre os dados obtidos podemos destacar:

1- A existência de locais improvisados incorretamente para o funcionamento como biotério (B6), sem áreas de apoio às salas dos animais, sem climatização, desinfecção e esterilização adequadas, dentre outras interferências, tais como, o excesso de barulho proveniente da rotina das salas de pesquisadores, além de equipamentos eletrônicos, que geram ruídos audíveis aos animais.

2- A necessidade de se promover e homogeneizar a individualização das espécies, visando o bem estar dos animais, mediante a utilização de *racks* ou estantes ventiladas ao invés de gaiolas comuns (abertas);

3- A necessidade de implementação de sistemas de climatização, ou seja, de adequação das temperatura e umidade relativa do ar, e de ventilação, por meio de insuflação e exaustão do ar, em quantidades adequadas de trocas de 100% do ar. Importante ressaltar ainda a utilização de filtros, prática que não é adotada nos biotérios B6, B7 e B8, sendo o B6 com sistema de exaustão alternado para funcionar de 15 em 15 minutos.

4- A necessidade de adoção de um sistema de controle da umidade relativa do ar nos B6, B7 e B10, pois nestes prevalece somente a umidade relativa do ar da sala em que os animais se encontram, quando o intervalo aceitável, não é garantido;

5- A necessidade de ampliação e/ou reestruturação física dos biotérios B3, B6, B11 e B13 para que haja a criação de corredores de acesso às salas de animais, implementação de barreiras sanitárias e de áreas de apoio. De

acordo com o que nos foi informado por meio dos questionários, acima de 76% da área total do biotério é destinado para alojamento dos animais, quando o indicado é de apenas 46%, para que assim seja possível atingir-se o bem estar e saúde dos animais;

6- A necessidade de serem adotadas técnicas de enriquecimento ambiental compatíveis com as espécies e as pesquisas desenvolvidas, pois essa prática se mostrou, apesar dos benefícios aos animais, pouco difundida;

7- A necessidade de se adequar o quadro de contratações de médicos veterinários segundo a legislação brasileira vigente. Dentre os biotérios aqui analizados, 77% não apresentam veterinário como responsável técnico ou dividem o mesmo profissional para atuar em até quatro biotérios diferentes, o que distancia o médico veterinário de um trabalho mais criterioso;

Com o presente trabalho, concluímos que os biotérios de animais de padrão sanitário convencional da USP, que foram analisados, apresentam inadequações de instalações e de funcionamento, posicionando, alguns destes, em um patamar de qualidade inferior aos padrões nacionais previstos. Em contrapartida, pudemos observar, sob a ótica de um número amostral pequeno nos B1, B9 e B12, avanços importantes na qualidade dos biotérios de animais de padrão sanitário SPF. Como discutido acima, a adequação dos biotérios às práticas que preveem o bem-estar dos animais de laboratório são pré-requisitos para uma sólida metodologia experimental, sendo as inadequações desses parâmetros responsável por gerar experimentos irreprodutíveis e sem respaldo científico.

6. Referências bibliográficas

ALVES, D. P.; PASSOS, L. A.C.P.; GUARALDO, A.M.A.; ZANFOLIN, M. Gnotobiologia. In: ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388 p. 2002.

AMY INGRAHAM, B.A. *et al*. **Sanitation Chemicals for Laboratory Animal Science**. 2013. Disponível em: http://www.alnmag.com/articles/2013/01/sanitation-chemicals-laboratory-animal-science. Acesso em: 17/09/2014.

ANDRADE, A. Biossegurança em Biotério. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: FioCruz, p. 381, 2002.

ANDRADE, A.; PINTO, SC.; OLIVEIRA, RS. (Orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388 p. 2002.

ANDRADE-SILVA, B.E. *et al*. Monitoramento dos pontos críticos relativos à biossegurança, barreiras sanitárias e macroambiente do biotério de experimentação do Pavilhão Leônidas Deane. **RESBCAL**, São Paulo, v.1 n.2, p. 195-200, abr./maio/jun. 2012.

ARRP - Animal Research Review Panel. Guidelines for the housing of mice in scientific institutions. 140p. 2012. Disponível em: http://www.animalethics.org.au/__data/assets/pdf_file/0004/249898/Guideline-22-mouse-housing.pdf. Acesso em: 23/01/2015.

ASTON, A. **Bedding for laboratory animals**. 2010. Disponível em: http://www.alnmag.com/articles/2010/11/bedding-laboratory-animals. Acesso em: 05/03/2015.

ÁVILA, V.P.F. **Efeito dos ruídos gerados por atividade humana em ratas *winstar*: avaliação da natimortalidade e desenvolvimento ponderal dos neonatos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre. 54 p. 2012

BAHIA (Estado). Secretaria da Saúde. Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde. Diretoria de Vigilância e Controle Sanitário. BRASIL. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Manual de Biossegurança. Salvador. 2001. Disponível em: http://www1.saude.ba.gov.br/divisa/arquivos/mat-publico/manual-biosseguranca.pdf. Acesso em: 18/10/2014.

BALCOMBE, J. Laboratory-rodent Welfare: Thinking Outside the Cage**. Journal of Applied Animal Welfare Science.** V. 13, N. 1: p. 77-88. 2009.

BAUMANS, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: Requirements of rodents, rabbits and research. In: **Enrichment Strategies for Laboratory Animals**. ILAR Journal 46, p.162–170. 2005.

BAUMANS, V. The welfare of laboratory mice. In: KALISTE, E. (Ed). **The Welfare of Laboratory Animals.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p 119-152. 2004.

BCCDC. A Guide to Selection and Use of Disinfectants. 2003. Disponível em: <https://uwaterloo.ca/safety-office/sites/ca.safety-office/files/uploads/files/guide-selection-use-of-disinfectants.pdf> Acesso em: 20/04/2015.

BELZ, E.E. *et al*. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. V. 76, n.3-4: p. 481-486. 2003.

BENAROYA-MILSHTEIN, N. *et al*. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **Eur J Neurosci.** V. 20. n.5: p. 1341-1347. 2004.

BICALHO, K.A., ARAUJO, F.T.M., ROCHA, R.S., CARVALHO, O.S. "Sanitary profile in mice and rat colonies in laboratory animal houses in Minas Gerais: I - Endo and ectoparasites". **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., Belo Horizonte , v. 59, n. 6, p. 1478-1484, Dec. 2007.

BLEBY, J Disease-free (SPF) animals. In "The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals". **Ed. UFAW**; 5ª ed.,127 p., 1976.

BMBL – **Biosafety in Microbiological and Biological Laboratories.** 5ªed. U.S. *Department of Health and Human Services Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health*. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação Geral das Unidades Hospitalares Próprias do Rio de Janeiro. Orientação Geral para a Central de Esterilização / Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação Geral das Unidades Hospitalares Próprias do Rio de Janeiro. Brasília: Ministério da Saúde. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Formulário terapêutico nacional 2008: Rename 2006 / Brasília. 2008. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/formulario_terapeutico_nacional_2008.pdf. Acesso em: 13/11/2014.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal CONCEA, estabelece normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a Regulamentação da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União,** Brasília-DF, 16 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº

3, DE 14 DE DEZEMBRO DE 2011, que Institui o Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa – CIAEP. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, Nº 240 – 15/12/11 – Seção 1 p. 39.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação. Resolução Normativa nº 6, de 10 de julho de 2012 - Altera a Resolução Normativa nº 1, de 9 de julho de 2010, que Dispõe sobre a instalação e o funcionamento das Comissões de Éticas no Uso de Animais (CEUA's). **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n.133, 11/07/12 – seção 1 – p.13.

BRASIL, 2009. Regulamentação da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União,** Brasília-DF, 16 jul. 2009.

BROOM, D.M.; MOLENTO, C.F.M. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas – revisão. **Archives of Veterinary Science,** v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.

BURN, C.C.; MASON, G.J. Absorbencies of six different rodent beddings: commercially advertised absorbencies are potentially misleading. **Lab. Anim**. V.39, N.1: p.68-74, jan, 2005.

CARDOSO. T.A.O. Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**. V. 64-67: p. 3-17, 2001.

CARISSIMI, A.S. *et al*. Effects of two ventilation system and bedding change frequency on cage environmental factors in rats (Rattus norvegicus). **Animal Technology**. V. 51: p. 161-170, 2000.

CASANOVA, V. **Métodos de limpieza, desinfección y esterilización**. Aprendiendo de los animales de laboratorio. 2013. Disponível em: http://www.bioterios.com/2013/post.php?s=2013-07-01-mtodos-de-limpieza-desinfeccin-y-esterilizacin. Acesso em: 20/11/2014.

CCAC- Canadian Council on Animal Care. **Guidelines on: Laboratory animal facilities – characteristics, design and development**. 2003.

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. A infra-estrutura de Biotérios no Brasil / Qualidade do modelo animal x qualidade da pesquisa. 2003. Disponível em: http://www.cgee.org.br/index.html. Acesso: 27/11/2014.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**. V. 28, n.1, p.11-23, 2007.

CHOW, P.K.H.; NG, R.T.H.; OGDEN, B.E. **Using Animal Models in Biomedical Research: A Primer for the Investigator.** Ed. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore. 279p., 2008.

CLOUGH, G. 1982. Environmental effects on animals used in biomedical research. ***Biol. Rev.*** V. 57: p.487-523. 1982.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Seminário Programa de Ação para Biotérios. 2003. Disponível em: file:///C:/Users/Notebook/Downloads/m02b05_doc_sintese.pdf. Acesso em: 22/11/2014.

CONCEA - CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Presidência da República – Casa Civil. Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm. Acesso em: 15/10/2014

CONCEA - CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 15, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2013. Disponível em: http://portal.datalegis.inf.br/action/ActionDatalegis.php?acao=detalharAtosArvorePortal&tipo=REN&numeroAto=00000015&seqAto=000&valorAno=2013&orgao=CONCEA/MCT. Acesso em: 13/12/2014.

COSTA, M.J.R.P.; PINTO, A.A. Bem-estar animal, In: RIVERA, E.A.B.; AMARAL, M.H.;NASCIMENTO, V.P. (Ed.). **Ética e biotética aplicada à Medicina Vaterinária**. Goiânia, 2006.

COUTO, S.E.R. Instalações e barreiras sanitárias. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: FioCruz, p.33–44. 2002a.

COUTO, S.E.R. Classificação de animais de laboratório quanto ao status sanitário. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: FioCruz, p. 59-63. 2002b.

COUTO, S.E.R. Equipamento materiais e insumo. In: COUTO, S.E.R. Instalações e barreiras sanitárias. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: FioCruz, p. 45-54. 2002c.

D'AQUINO, M.; REZK, R. **Desinfección, desinfectantes, desinfestantes, limpieza**. Editorial Eudeba. Bs. As. Rep. Argentina. 1995.

DE LUCA, R.R. *et al*. **Manual para Técnicos em Bioterismo.** 2.ed. São Paulo: Winner Graph; 1996.

DONNELLY, T.M. Disease Problems of Small Rodents. Disease problems of small rodents. In: Hillyer, E.V.; Quesenberry, K.E. (Orgs). **Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and Surgery**. 2ªed, W.B. Saunders, Philadelphia – EUA, 2004.

DUKE UNIVERSITY AND MEDICAL CENTER. Animal Care and Use Program. Guidelines for Sterilization and Disinfection. 2001 Disponível em: http://vetmed.duhs.duke.edu/GuidelinesforSterilization.html. Acesso em: 15/01/2015.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O. Modelo animal de doença: critério de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta. Cirúrgica Brasileira.** V. 19, n.2: p.59-65. 2004.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. Vinícius Jardini. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo , v. 20, supl. 2, p. 28-34, 2005.

GILIOLI, R., ANDRADE, L.A.G., PASSOS, L.A.C., SILVA, F.A., RODRIGUES DM, GUARALDO, A.M.A. "Parasite survey in mouse and rat colonies of Brasilian laboratory animal houses kept under differents sanitary barrier conditions". **Arq Bras Med Vet Zootec**.52(1):33-7, 2000.

GÓRSKA, P. Principles in laboratory animal research for experimental purposes. **Med Sci Monit**. V. 6, n.1: p.171-180, 2000.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council. **National Academies Press**. 80ªed. Washington DC, 2011. Disponível em: http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-Laboratory-animals.pdf. Acesso em: 12/02/2015.

HANSEN, A.K.; BAUMANS, V. Housing, care and environmental factors. In: KALISTE, E. (Ed.). **The Walfare of Laboratory Animals.** Springer: The Netherlands. Cap.4, p. 34-50. 2007.

HAU, J.; HOOSIER Jr, G.L.V. **Handbook of Laboratory Animal Science – Volume I: Essential Principles and Practices**. 2ªed. CRC Press – EUA. 2003.

HEFFNER H.E.; HEFFNER, R.S. Hearing ranges of laboratory animals. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**.46:11-3. 2007.

HESSLER, J.R.; HÖGLUND, U. Laboratory Animal Facilities and Equipment for Conventional, Barrier, and Containment Housing Systems. In: **Handbook of Laboratory Animal Science**, Vol. 1, 2nd ed. (Hau J. and Van Hoosier G.L. Jr., eds.) Boca Raton FL: CRC Press, chapter 8, p. 127-172. 2003.

HESSLER, J. R.; LEARY, S. L. Design and management of animal facilities. In: FOX, J.G.; ANDERSON, L.C.; LOEW, F.M.; QUIMBY, F.W. (Orgs.). **Laboratory Animal Medicine**. California, USA: Academic Press. p. 909-953. 2002.

HUERKAMP, M. J. **Animal facility environmental control and monitoring**. Division of Animal Resources. Emory University. 2012. Disponível em: http://www.dar.emory.edu/pi/environmental_control.php. Acesso em: 20/11/2014.

HUTCHINSON, E.; AVERY, A., VAN DE WOUDE, S. Environmental Enrichment For Laboratory Rodents. ILAR J 46:p.148-161. 2005.

Institutional Animal Care and Use Committee - ACUP. Personal Protective Equipment. Cornell University. 2014. Disponível em:

http://www.research.cornell.edu/care/documents/ACUPs/ACUP715.pdf. Acesso em: 12/02/2015.

JORGE, T.C.A.; CASTRO, S.L. (Orgs). **Protocolos e métodos de trabalho em doença de Chagas experimental - Cuidados especiais com animais no biotério de experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 368 p. 2000.

KALIL, E.M.; COSTA, A.J.F. Desinfecção e Esterilização. **Acta Ortop Bras**. V.2, n.4: p. 1-4 - OUT/DEZ. 1994.

KALISTE, E.; MERING, S. The welfare of laboratory rats. In: KALISTE, E. **The Welfare of Laboratory Animals**. Vol 2. Springer. Hämeenlinna - Finlândia. p. 153-180. 2007.

KEENAN, K.P. *et al*. Diet, caloric restriction, and the rodent bioassay. **Toxicol Science**. V. 52, n.2: 24-3. 1999.

LAINETTI, E.B.F. **Análise crítica para adequação física e implantação de novos procedimentos na divisão de animais de laboratório do IPEN.** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP. Dissertação (Mestre em Ciências em Tecnologia Nuclear).São Paulo, 136p. 2009.

LENGERT, H. P. **Desinfecção e Esterilização**. Trabalho de conclusão apresentado à Escola de Saúde do Exército. Especialização em Aplicações Complementares às ciências Militares. Rio de Janeiro 38p. 2008.

LIDFORS, L., EDSTRÖM, T., LINDBERG, L. The welfare of laboratory rabbits. In: The Welfare of Laboratory Animals. (Kaliste, E., ed.) ISBN-10: 1402022700, Springer, 211-243. 2007.

LIED, E.B. Dimensionamento de sistema de ventilação local exaustora (VLE): estudo de caso de uma indústria de móveis, em Santa Terezinha de Itaipu, PR, Brasil. **Estudos Tecnológicos** - Vol. 7, n° 1: p. 1-11, jan/abr, 2011.

MAJEROWICZ, J. Biossegurança em Biotérios. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento.** Ed. 30, p.105-108, jan-jun, 2003.

MAJEROWICZ, J. **Procedimentos de biossegurança para as novas instalações do Laboratório de Experimentação Animal (Laean) de Bio-Manguinhos**. 101f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos). Instituto Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro. 2005.

MARTINEWSKI, A.; CORREIA, C.S.C.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.L.B. Mouse housing system using pressurized cages intraventilated: Reproductive performance and lung histopathology. **Open Journal of Animal Sciences**. V.3: p. 154-159, 2013.

MEMARZADEH. F. **Ventilation Design Handbook on Animal Research Facilities Using Static Microisolators.** Vol 1. NIH – National Institutes of Health. Division of Technical Resources. Bethesda, Maryland. 1998.

MEYER, S.T. O Uso de Cloro na Desinfecção de Águas, a Formação de Trihalometanos e os Riscos Potenciais à Saúde Pública. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, V.10, n.1: p. 99-110, jan/mar. 1994.

MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R**. Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Vol 1. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC. 290p. 2009.

MORGULIS. M. S. F. A.; SPINOSA, H. S. **Antimicrobianos: Desinfetantes**. 1. ed. São Paulo: ROCA, Farmacologia aplicada à avicultura. 106p. 2005.

MORIYA, T.; MÓDENA, J.L.P. **Assepsia e antissepsia: técnicas de esterilização.** Simpósio: Fundamentos em clínica cirúrgica - 1a Parte. Medicina – Ribeirão Preto. V.41, n.3: p.265-73, 2008.

MORONI, F.T.; LOEBEL, E. **A Prática de Gestão e Formato Organizacional de Biotérios em Universidades Públicas Brasileiras**. XXXVIII Encontro da ANPAD. Rio de Janeiro, 13 a 17 de setembro. 2014

MORTON, D.B. Experimental procedures: general principles and recommendations. In: KALISTE, E. (Ed.). **The walfare of laboratory animals.** Springer, Dordrecht, p. 81-115. 2004.

NAHAS, H.G. **Desenvolvimento Tecnológico de Sistemas Microambientais para Biotérios de Criação, Manutenção e Experimentação de Pequenos Animais.** Programa de Inovação Tecnológica em Pequenas Empresas (PIPE). 2002. Disponível em: http://revistapesquisa.fapesp.br/2002/02/01/bioterio-renovado/. Acesso em: 14/01/2015.

NOMURA, T; YONEZAWA, K. A comparison of four systems of group mating for avoiding inbreeding. **Genet Sel Evolution**. V.28, 141-159, 1996.

NRC. National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources. Comission on life sciences. **Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório**. Goiânia: AAALAC/COBEA, 162p. 2003.

OACU - Office of Animal Care and Use. **Guidelines for Personnel Protection in Animal Facilities**. 2013. Disponível em: http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/PPE.pdf. Acesso em: 17/02/2015.

PAIVA, F.P; MAFFILI, V.V; SANTOS, A.C.S (orgs). Curso de manipulação de animais de laboratório. Ministério da Saúde: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador-BA. 2005.

PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; FERREIRA NETO, José Soares; MORAIS, Z. M.. Influência da matéria orgânica na atividade micobactericida de cinco desinfetantes de uso pecuário. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 29, n.1, p. 51-60, 1992.

POLITI, F.A.S.; MAJEROWICZ, J.; CARDOSO, T.A.O.; PIETRO, R.C.L.R.; SALGADO, H.R.N. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**., v. 29, n. 1, p. 17-28, 2008.

PORTAL BRASIL **-** Biotérios devem ter médico veterinário como responsável. 2014. Disponível em: < http://www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2014/06/bioterios-devem-ter-medico-veterinario-como-responsavel> Acesso em 14/12/2014.

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA. **Programa de Apoio aos Biotérios da USP.** Disponível em: http://www.prp.usp.br/programas/bioterios/. Acesso em: 16/02/2015.

RANA, S.V.S. **Biotechniques Theory & Practice**, Rastogi Publications. 2008. 388p.

REEB-WHITAKER *et al*. The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages. **Laboratory Animals**. V. 35, 58-73, 2001.

REEB, C.K., JONES, R.B., BERARG, D.W.,BEDIGIAM, H., MYERS, D.D., PAIGEN, B. Microenvironment in ventilated animal cages with differing ventilation rates, mice populations, and frequency of bedding changes. Contemp. Top. Lab. Anim. Sci. 37:43-49; 1998.

REINHARDT, V.; REINHARDT, A. **Variables, refinement and environmental enrichment for rodents and rabbits kept in research institutions - Making life easier for animals in laboratories**. Animal Welfare Institute: Washington, DC. 2006. 71p.

RIVERA, E.A.B. "Ética na experimentação animal e alternativas ao uso de animais". In: RIVERA, E.A.B.; AMARAL, M.H.; PINHEIRO, V. (Orgs.). **Ética e Bioética Aplicadas à Medicina Veterinária.** 1ª Ed. Goiânia: Ed/orgs.v.1. p.159-186. 2006.

ROMANO, T. **Animal Tracks – A newsletter for the Duck research community**. 2009. Disponível em: http://vetmed.duhs.duke.edu/PDF/Animal%20Tracks/2009_05_Animal_Tracks.pdf. Acesso em: 15/12/2014.

ROQUE. B.A.; CERCHI, F.; OLIVEIRA, G.A. **Projeto de um sistema de Ventilação Geral Diluidora.** Graduação em Engenharia Mecânica - Universidade Federal de Uberlândia. Minas Gerais. 2011. Disponível em: http://www.ebah.com.br/content/ABAAAe9Y8AA/vgd-vi. Acesso em: 03/02/2015.

ROSENBAUM, M.D *et al*. Macroenvironmental and Microenvironmental Disparities in Ammonia, Temperature, Humidity and Airborne Particulate Matter in Individually Ventilated Caging Housing Mice. **JAALAS**, v.49 n.2: p.177-83, 2010.

ROSENKRANZ, A., JURKIEWCZ, A., CORRADO, A. Situação dos biotérios brasileiros: fator limitante de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos de produtos naturais. **Ciênc. Cult**., v.32, p.156-163, 1978.

RUSSELL, WMS.; BURCH, RL. **The Principles of Humane Experimental Technique**. 1959. Disponível em http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm. Acesso em 22/11/14.

RUTALA, W.A.; WEBER, D.J. **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities**. CDC Stacks: Public Heath Publication. 2008.

SACHSER, N.; KÜNZL, C.; KAISER. The welfare of laboratory guinea pigs. In: **The Welfare of Laboratory Animals**. p.181-210. 2007.

SANTOS, B.F. Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao Status Genético. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: FioCruz, Cap.9. p. 65-70. 2002.

SCHNAIDER T B, SOUZA C. Aspectos Éticos da Experimentação Animal. **Revista Brasileira de Anestesiologia** v. 53, n. 2, p. 278-285. 2003.

SEELIG, V.C. **Questões atuais relacionadas ao uso de modelos animais em pesquisa científica**. Especialização (Análises Clínicas Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre/RS. 40p. 2007.

SIMPSON, J.; KELLY, J.P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. **Behav Brain Res,** V. 222, n.1: p. 246-64. 2011.

STEWART, K. Development of an environmental enrichment program utilizing simple strategies. **AWIC Bull**. V.12: p.1-2. 2004.

SZTAINBERG, Y; CHEN, A. An environmental enrichment model for mice. **Nature Protoc.** V. 5, n.9: p. 1535-1539. 2010.

TEIXEIRA, M. A.; CHAGURI, L. C. A. G.; CARISSIMI, A. S.; SOUZA, N. L., MORI, C. M. C.; SALDIVA, P. H. N.; LEMOS, M.; MACCHIONE, M.; GUIMARÃES, E. T.; KING, M.; MERUSSE, J. L. B.Effects of an individually ventilated cage system on airway integrity of rats (Rattus norvegicus) in a laboratory in Brazil. **Laboratory Animals**. V. 40, p. 419-431, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, v. 1, 780 p. 2008.

VESELL, I.S. Induction of drug-metabolizing enzymes in liver microsomes of mice and rats by softwood bedding. **Science.** V.157: p. 1057–1058. 1967.

WOLFENSOHN, S.; LLOYD. M. **Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare**. Blackwell Science Ltd. 3ª ed. Oxford, 2003.

WÜRBEL, H., Environmental enrichment does not disrupt standardisation of animal experiments. **ALTEX 24 – Special Issue**. p. 70-73. 2007.

7. Anexo 1: Questionário

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

- **Caracterização física e ambiental de biotérios**

O Sr.(ª) (Responsável pelo biotério):_____

_____

está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa "**Caracterização física e ambiental de biotérios de experimentação**" sob responsabilidade da pesquisadora Eliane Alves da Silva Pinho – Graduanda em Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Com a orientação da Profa. Dra. Nivea Lopes de Souza – Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, e coorientação da Profa. Dra. Elisabeth Spinelli de Oliveira - Departamento de Biologia - Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento (LECO) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

Os biotérios de experimentação normalmente são de responsabilidade de departamentos ou Unidades específicas e contam com a colaboração dos pesquisadores envolvidos para a construção e manutenção de ambientes adequados aos animais. Levando em consideração que fatores ambientais podem ter um efeito significativo sobre a saúde e o bem-estar dos animais, e como consequência no resultado experimental, este trabalho visa traçar o perfil físico e ambiental de biotérios pertencentes à USP, onde são produzidas significativas pesquisas envolvendo animais.

- Sua colaboração para o presente estudo implica no preenchimento de um questionário com perguntas abertas, relacionadas ao assunto.

Sua contribuição para esta pesquisa será de grande valor, pois trará informações importantes sobre o atual quadro de funcionamento dos biotérios pertencentes à USP. Todavia, esta participação é voluntária e poderá haver desistência a qualquer tempo, sem prejuízos à continuidade do estudo.

Autorização

Eu,_____, declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

- **CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E AMBIENTAL DE BIOTÉRIOS**

- QUESTIONÁRIO

Preenchimento opcional

Identificação/Nome do biotério: .....

Faculdade/Unidade: .....

Responsável/Coordenador: .....

1. Qual é o tipo de biotério?

( ) Produção ( ) Experimentação ( ) Criação e manutenção

Comentários:_____

_____

_____

2. Qual é a área total do biotério?

_____

_____

3. Quais espécies são produzidas e/ou mantidas em experimentação?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

4. Quais são as linhagens ou raças dos animais produzidos e/ou mantidos em experimentação?

_____

_____

_____

_____

_____

_____

5. Qual é a área destinada, especificamente, ao alojamento dos animais (m^2)?

_____

_____

_____

_____

_____

6. Há corredores de acesso às salas de animais?

_____

_____

_____

_____

_____

7. Os animais são mantidos em gaiolas que ficam dispostas em:

( ) Estantes comuns ( ) Estantes ventiladas ( ) *Racks* com ventilação *intra cage*

Comentários:_____

_____

_____

8. Neste biotério há área de higienização, desinfecção e esterilização de materiais?

_____

_____

_____

_____

_____

9. Qual(is) o(s) desinfetante(s) utilizado(s)?

_____

_____

_____

_____

_____

10. Quais as barreiras sanitárias de que o biotério dispõe?

_____

_____

_____

_____

_____

11. Qual material é utilizado como cama para os animais?

_____

_____

_____

12. Qual é a periodicidade de troca da cama e de reposição de água e ração?

_____

_____

_____

13. Como as salas de animais são estruturadas em termos de iluminação e qual é o fotoperíodo?

_____

_____

_____

_____

14. Qual é o número de trocas de ar/hora nas salas de animais? O ar passa por algum processo de filtração?

_____

_____

_____

15. Há controle de temperatura e umidade relativa do ar? Como é realizado?

_____

_____

_____

_____

16. Qual é o número de animais por gaiola (mínimo e máximo)?

_____

_____

_____

17. São adotadas técnicas de enriquecimento ambiental para os animais? Quais?

_____

_____

_____

_____

18. Qual o número de graduandos e pós-graduandos que tem animais neste biotério, sob experimentação? Qual sua caracterização (Iniciação Científica, Aperfeiçoamento, Mestrado, Doutorado, outro)?

_____

_____

_____

_____

19. Quantos técnicos trabalham no biotério? Estes técnicos são exclusivos deste setor?

_____

_____

_____

_____

20. Qual é o nível de escolaridade dos técnicos do biotério?

_____

_____

_____

_____

21. Há escala de plantonistas aos finais de semana e feriados?

_____

_____

_____

22. Os técnicos utilizam equipamentos de proteção individual (EPIs)? Quais?

_____

_____

_____

23. O biotério tem veterinário que atue como Responsável Técnico? (Nome, CRMV e e-mail)

_____

_____

_____

24. O biotério está cadastrado na Pró-Reitoria de Pesquisa da USP?

( ) Sim ( ) Não

Comentários:_____

_____

Espaço para observações adicionais: _____

_____

_____

_____