

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Análise morfológica do epitélio respiratório e avaliação radiológica do trato respiratório de cobaias (*Cavia porcellus*) mantidas sob diferentes sistemas de ventilação.

Rochana Rodrigues

Porto Alegre
2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Análise morfológica do epitélio respiratório e avaliação radiológica do trato respiratório de cobaias (*Cavia porcellus*) mantidas sob diferentes sistemas de ventilação.

Rochana Rodrigues

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. André Silva Carissimi

Porto Alegre
2007

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que está ao meu lado em todos os momentos da vida.

Aos meus pais Mário e Lúcia pelo amor, pelo incentivo e apoio.

À minha alma gêmea, meu amado, colega, companheiro, incentivador Tobias por ser esta pessoa maravilhosa que está sempre ao meu lado me apoiando, auxiliando e tornando minha vida mais doce.

À Ana, Paulo, Michele, Fabiano, Cíntia e Kelsion pelo carinho com o qual me acolheram.

Aos amigos Cássio e Herbert pelo incentivo e ajuda.

À amiga June pela ajuda na estruturação da dissertação.

Aos estagiários Fabíola, Mauro, Luciane, Vanessa e Lisi obrigada pela dedicação e esforço na execução do experimento.

Ao Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, especialmente o Setor de Radiologia e os Médicos Veterinários Fábio, Mesquita e Denise pela colaboração na realização e interpretação dos exames radiológicos.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Silva Carissimi, pela disponibilidade, atenção, orientação, dedicação e amizade prestadas durante o período de mestrado.

À Dona Geni, Carmona, Márcio, Paula e demais funcionários do CREAL pela atenção e ajuda.

Aos porquinhos-da-Índia e todos os animais que são utilizados para experimentação, muito obrigada pela doação silenciosa.

À UFRGS por mais uma vez permitir meus estudos de forma gratuita.

RESUMO

Na última década, o uso de sistemas microventilados (sistema VMA) em biotérios possibilitou alojar animais com melhor qualidade sanitária devido ao maior controle ambiental fornecido por esses sistemas. Contudo, ainda é necessária uma melhor avaliação, principalmente no que tange às respostas dos animais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a integridade do aparelho respiratório (pulmões e traquéia) de cobaias mantidas sob dois sistemas de ventilação diferentes: ventilação geral diluidora (VGD) ou ventilação para conforto e ventilação microambiental (VMA). Foram utilizados quatro grupos de animais que ficaram alojados por 180 dias no CREAL-UFRGS. Os animais foram acompanhados com exames radiológicos dos pulmões a cada 45 dias. A histopatologia foi realizada no último dia de acompanhamento dos animais. Os resultados da análise radiológica não demonstraram diferença significativa entre as lesões pulmonares de cobaias fêmeas e machos mantidas sob os dois sistemas de ventilação. A avaliação histopatológica evidenciou lesões descamativas e de metaplasia no epitélio da traquéia de animais de ambos os sexos e sistemas de ventilação. As lesões encontradas nos pulmões das cobaias machos e fêmeas de ambos os sistemas foram em sua maioria lesões inflamatórias, com intenso infiltrado de mononucleares. A presença e intensidade dessas lesões variaram de acordo com o sistema de ventilação sendo que no grupo VGD é que foram encontradas lesões mais severas.

Palavras-chave: cobaia, pulmões, traquéia, lesão, patologia

ABSTRACT

During the last decade, the use of intracage ventilation systems (VMA) in animal facilities has improved the health status of animal by better environmental control supplied by these systems. Yet, here is little information upon use of VMA systems, mainly in that it refers to animal responses. Thus, the purpose in this investigation was to evaluate epithelial integrity in airways (trachea and lungs) of Guinea pigs kept in two different systems: general diluting ventilation system or comfort ventilation system (VGD) and intracage ventilation systems (VMA). Four groups of animals were kept for 180 days on CREAL- UFRGS. The animals were observed with radiological exam taken from lungs every 45 days. The histopathology was done in the last day of trial. The results show the radiological exams haven't differences between lung injuries from males and females kept in two different ventilation systems. The histological examination showed lost and changes of trachea epithelium in both, male and female under two different ventilation. The injuries found in lung from Guinea pigs, male and female, under two different ventilation were in the most inflammatory injuries, predominantly mononuclear cells. Intensity of lesions varied according to the ventilation system wich animals were kept, the animals kept in VGD system have presented more intensity of injuries.

Keywords: guinea pigs, lungs, trachea, injury, pathology

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	11
2 - REVISÃO	12
2.1 - HISTÓRICO	12
2.2 - USO DA COBAIA COMO ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO	13
2.3 - CONTROLE AMBIENTAL EM BIOTÉRIOS.....	14
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 - ANIMAIS	22
4.2 - LOCAL	22
4.3 - CAMA	22
4.4 - FOTOPERÍODO	23
4.5 - SISTEMAS DE VENTILAÇÃO.....	23
4.5.1 - Sistema de Ventilação para conforto (VGD)	23
4.5.2 - Protótipo de Sistema de Ventilação Microambiental (VMA).....	23
4.6 - TEMPO DE ALOJAMENTO	24
4.7 - EUTANÁSIA.....	24
4.8 – COLETA DE MATERIAL DA TRAQUÉIA E PULMÕES	25
4.9 – AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE TRAQUÉIA E PULMÕES.....	25
4.10 - SISTEMA DE CAPTURA DE IMAGEM	26
4.10.1 - Hardware	26
4.10.2 - Softwares utilizados	26
4.11 - EXAME RADIOLÓGICO	28
4.12 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
4.12.1 - Grupos	29
4.13 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5 - RESULTADOS	30
5.1 - AVALIAÇÃO POR ESCORES DE PULMÕES	30
5.2 -AVALIAÇÃO POR ESCORE DE TRAQUÉIA	34
5.3 – AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA.....	38
6 - DISCUSSÃO	41
7 - CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS	45

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 Protótipo do sistema de ventilação microambiental (VMA).....	24
FIGURA 2 Parte do sistema de captura de imagem (microscópio e câmera).Faculdade de Veterinária – UFRGS, 2007	27
FIGURA 3 Tela do programa <i>Pixelview Station</i> v. 4.29TV em uso.....	27
FIGURA 4 <i>Boxplots</i> dos escores de avaliação histopatológica dos pulmões de cobaias fêmeas (F) e machos (M) mantidos sob os sistemas de ventilação microambiental (VMA) e ventilação para conforto (VGD).....	32
FIGURA 5 Pneumonia intersticial, presença de infiltrado inflamatório no pulmão de cobaia fêmea, mantida sob sistema VGD.....	33
FIGURA 6 Núcleos de infiltrados inflamatórios no pulmão de cobaia macho, mantida sob sistema VMA.....	33
FIGURA 7 <i>Boxplots</i> dos escores de avaliação histopatológica da traquéia de cobaias fêmeas (F) e machos (M) mantidos sob os sistemas de ventilação microambiental (VMA) e ventilação para conforto (VGD).	36
FIGURA 8 Perda de cílios e presença de metaplasia no epitélio da traquéia de cobaia macho mantido sob sistema VGD.....	37
FIGURA 9 Descamação do epitélio e metaplasia da traquéia de cobaia fêmea mantida sob sistema VMA.....	37
FIGURA 10 Representação gráfica dos valores médios da avaliação radiológica periódica, tendo em vista o padrão pulmonar de cobaias sob sistemas de ventilação para conforto (VGD) e microambiental (VMA).....	39
FIGURA 11 Exames radiológicos realizados na posição látero-lateral de pulmão de cobaias sob sistema VGD. A esquerda um macho com 90 dias e grau 2 de lesões e a direita, uma fêmea com 135 dias e grau 3.....	40

FIGURA 12 Exames radiológicos realizados na posição látero-lateral de pulmão de cobaias sob sistema VMA. A esquerda um macho com 90 dias e grau 1 de lesões e a direita, uma fêmea com 135 dias e grau 2..... 40

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 - Avaliação histopatológica por escores dos pulmões de cobaias mantidas sob os sistemas de ventilação para conforto (VGD) e microambiental (VMA). Porto Alegre, 2007.....	31
TABELA 2 - Avaliação histopatológica por escores de traquéia de cobaias mantidas sob os sistemas de ventilação para conforto (VGD) e microambiental (VMA). Porto Alegre, 2007.....	35
TABELA 3 - Escores médios da avaliação radiológica nos dias zero, 45, 90, 135 e 180 de experimentação. Porto Alegre, 2007.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO ₂	Dióxido de carbono
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
HE	Hematoxilina-eosina
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
MHV	Vírus da hepatite viral murina
NH ₃	Amônia
PIV	<i>Positive intracage ventilation</i>
ppm	Partes por milhão
PVC	Polivinilcarbonato
SPF	Animais livres de patógenos específicos
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VGD	Ventilação para conforto
VLE	Ventilação para processo
VMA	Ventilação microambiental

1 - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a preocupação com o bem-estar animal tem sido evidente, principalmente em relação ao seu uso para experimentação (CLARK; RAGER; CALPIN, 1997). O controle ambiental dos recintos animais é um dos aspectos estudados, pois as respostas fisiológicas e comportamentais destes animais estão relacionadas com o ambiente.

Uma série de poluentes (gasosos e particulados) é continuamente gerada pelos animais de laboratório no biotério, tornando-se assim imprescindível a sua retirada e o conseqüente fornecimento de ar novo, limpo e em quantidade e qualidade adequadas (SLAS, 1989). A existência destes poluentes no interior das gaiolas pode ser comparável com a poluição atmosférica urbana, e desta forma, desencadear processos patológicos principalmente no sistema respiratório. Estudos preliminares (CARISSIMI et al., 2000; CHAGURI et al., 2001) demonstraram que animais (camundongos e ratos) submetidos a melhores condições de ventilação possuíam menor incidência de lesões pulmonares. Baialardi (2003) observou diferenças nas variáveis morfométricas do trato respiratório de ratos (volume de cílios, volume de células, número de núcleos, volume de muco) em função do tipo de alojamento nos quais os animais foram mantidos. Entretanto, é oportuno avaliar a incidência de lesões para outras espécies de animais de laboratório, como, por exemplo, a cobaia, correlacionando-as com o tipo de alojamento no biotério. O presente trabalho objetiva estudar a incidência de lesões em regiões do sistema respiratório (traquéia e pulmões) de cobaias mantidas em dois diferentes sistemas de ventilação.

2 - REVISÃO

2.1 - Histórico

A cobaia, *Cavia porcellus*, popularmente conhecida como “porquinho-da-Índia”, é um roedor da subordem hystricomorpha, originária da América do Sul, mais precisamente dos Andes. Sua distribuição geográfica abrange Colômbia, Venezuela, Brasil, Argentina, Paraguai além do Peru (HILLVER; QUESENBERRY, 1997). É considerada uma espécie convencional de animal de laboratório, ou seja, comumente utilizada para experimentação. Entre as características que a tornaram uma excelente escolha como modelo animal estão a facilidade para manipulação pela docilidade, pois esses animais raramente mordem ou arranham, e o fato de suas excretas não produzirem um odor tão forte quanto às de outros roedores (TERRIL; CLEMONS, 1998). Apesar dessas vantagens, atualmente o seu uso vem sendo reduzido, basicamente pelo maior custo de criação e alojamento.

A variedade mais freqüente nos laboratórios é a Inglesa, cujas linhagens mais populares são a Duncan - Hartley e Hartley (TERRIL; CLEMONS, 1998).

A cobaia é um roedor com características peculiares em relação à alimentação, bem diferente dos ratos e camundongos. É um animal estritamente herbívoro, sendo que os filhotes já se alimentam com sólidos a partir do segundo dia de vida (QUINTON, 2005). Da mesma forma que os primatas, as cobaias não possuem a enzima L-gluconolactona oxidase, integrante da via metabólica que leva a formação de vitamina C a partir da glicose. Devido a este fato, esses animais obrigatoriamente necessitam de suplementação diária de ácido ascórbico na dieta, variando de 5mg/kg quando em manutenção até 30mg/kg durante a gestação e lactação. O fornecimento de ácido ascórbico pode ser feito na água do bebedouro (1g/l), ou através de vegetais e frutas

(couve e laranja) ou ainda adicionada na própria ração peletizada (HARKNESS; WAGNER, 1989).

As cobaias realizam coprofagia, porém a quantidade de fezes ingerida, bem como a contribuição desta na dieta total ainda é desconhecida. Os pellets de fezes ingeridos são retirados diretamente do ânus, mas animais obesos e prenhes podem ingerir os pellets de fezes do chão (ANDERSON, 1998). Os filhotes ingerem fezes maternas e assim, colonizam a flora intestinal.

2.2 - Uso da cobaia como animal de experimentação

Embora a cobaia possa ser utilizada nas mais diferentes áreas do conhecimento, na prática tem seu uso direcionado para estudos nas áreas da reprodução, da medicina cardiovascular, estudos otológicos e da imunologia.

As cobaias são consideradas ótimos modelos para estudos cardiovasculares, pois o padrão do eletrocardiograma desses animais é muito similar aos dos humanos, com ondas P, Q, R, S e T bem definidas. Além disso, esses animais apresentam, assim como os humanos, a onda T bem separada do complexo QRS (HARKNESS; WAGNER, 1989).

Já na área da reprodução, as cobaias apresentam algumas similaridades com a biologia reprodutiva humana. Assim como os humanos, as cobaias têm ovulação espontânea e corpo lúteo ativo. O fato de serem poliétricas, apresentarem ciclos não sazonais e terem estro visível, facilita a reprodução desta espécie em laboratório (TERRIL; CLEMONS, 1998).

No campo da imunologia, a cobaia é um modelo clássico para indução de antígenos na resposta da anafilaxia respiratória imediata (TERRIL; CLEMONS, 1998).

Estes produzem anticorpos para proteínas específicas e a produção de anafilaxia é um indicador da presença de antígeno.

A localização anatômica do timo permite facilidade de acesso e remoção, colaborando ainda mais na consolidação da cobaia como modelo animal na área da imunologia.

Paralelamente, a cobaia pode ser facilmente sensibilizada com antígenos em geral, produzindo uma excelente resposta humoral devido à alta atividade do sistema complemento (HAWK; LEARY, 1995).

Na imunologia, em função das peculiaridades e cuidados que a pesquisa envolvendo o sistema imunológico requer, é muito importante o uso de animais sanitariamente definidos para o sucesso das pesquisas, pois a presença de uma microbiota patogênica pode vir a alterar os resultados experimentais. É lógico pensar que a utilização de animais sadios é algo desejável para todas as áreas da pesquisa biológica, porém, na imunologia, é compulsória a utilização de animais criados e mantidos em condições hípidas.

2.3 - Controle ambiental em biotérios

Os animais de laboratório são importantes ferramentas à disposição da ciência, sendo utilizados, direta ou indiretamente, como reagentes biológicos nos mais diversos protocolos experimentais. Com o avanço da ciência, houve uma qualificação dos serviços prestados pelos biotérios, que passaram a produzir animais de padrão genético conhecido (p.ex. linhagens isogênicas, mutante e *knock-out*) e sanitariamente definidos (p.ex. animais SPF, ou seja, animais livres de patógenos específicos) visando ao máximo o princípio da reprodutibilidade experimental, uma exigência da ciência moderna.

Devido a indissociabilidade dos padrões genético e sanitário com o ambiente físico, houve uma preocupação com a padronização do ambiente onde os animais são criados e mantidos. O controle ambiental é importante para evitar que alterações nas variáveis ambientais influenciem negativamente as respostas dos animais em experimentação (CASSEL; LINDSEY; DAVIS, 1981).

Durante décadas, acreditava-se que controlando as condições ambientais da sala de animais (macroambiente) seria suficiente para fornecer um ambiente adequado para os animais. Assim, aplicou-se às salas de animais os conceitos utilizados para conforto humano. Embora, indiscutivelmente eficiente para o homem, o emprego desse princípio em biotérios demonstrou-se inadequado, pois as variáveis ambientais dentro das gaiolas dos animais (microambiente) possuem características ambientais distintas às do macroambiente, principalmente em função dos mecanismos de trocas térmicas e liberação de gases que se processam no interior da gaiola. Alguns autores observaram que produtos como vapor de água, dióxido de carbono (CO_2), partículas em suspensão e amônia (NH_3) tendem a níveis mais elevados no microambiente (OPAS, 1968; CCAC, 1980; SLAS, 1989). Para se obter condição ambiental propícia à criação dos animais é necessária a remoção desses poluentes, seja por meios naturais ou mecânicos, através do processo de ventilação (MACINTYRE, 1990). Didaticamente, a ventilação divide-se em dois grandes princípios: a ventilação para processo (VLE) e a ventilação para conforto (VGD). A VLE consiste na retirada de poluentes industriais enquanto a VGD baseia-se no controle de temperatura e redução da tensão de dióxido de carbono (CO_2) em ambientes destinados à utilização humana (ASHRAE, 1997).

A aplicação da VGD em biotérios iniciou-se em meados dos anos 40, com a utilização de um sistema no qual se efetuava a ventilação de biotério por meio de uma mistura de ar externo e interno, recirculado após a filtragem (MUNKELT, 1938).

Durante muitos anos, o princípio da VGD foi empregado em biotérios. Em 1963, Alschuler, com objetivo de contornar as limitações da VGD em biotérios, propôs um novo padrão de VGD no qual a temperatura deveria ser mais uniforme possível, a umidade relativa deveria ser em torno de 50%, com uma taxa de renovação do ar de 18 trocas de ar por hora, sem recirculação, e insuflação pelo teto e exaustão na altura do piso. Dessa maneira, os biotérios equipados dentro dessa nova recomendação apresentaram ambientes de melhor qualidade. Entretanto, nem todas as limitações da VGD foram superadas, pois não possibilitava a renovação direta do ar no microambiente.

Na década de 70, Lane-Peter (1970) propôs o uso de uma estante constituída por uma câmara capaz de promover um fluxo de ar filtrado sobre as gaiolas, utilizando o ar proveniente da sala. Com um equipamento semelhante, Vand Der Waaij e Andreas (1971) conseguiram prevenir a contaminação de animais gnotobióticos mantidos em caixas sem coberturas filtrantes. O primeiro gabinete para animais a operar com sistema de ar condicionado foi descrito por Egan e Butler (1972) para o alojamento de frangos SPF. Utilizando o mesmo princípio, Rylander e Hellström (1973) demonstraram a redução da carga microbiana no interior de um gabinete para a manutenção de cobaias. O equipamento preconizado pelos autores foi o primeiro a operar com pressão interna maior que a externa.

Keller, Mattingly e Knape (1983) foram os primeiros a adotar um sistema de ventilação individual para gaiolas providas de cobertura filtrante, com a finalidade de reduzir os níveis de amônia no microambiente. Com esse sistema, as caixas ventiladas apresentaram níveis internos de amônia (NH_3) entre 0 e 25 ppm, após 72 horas de alojamento dos animais (cinco camundongos adultos por caixa).

O uso de ventilação não reduz apenas a possibilidade de contaminação em biotérios e remoção de poluentes como também, permite certo grau de conforto térmico por meio da convecção forçada. Esse fenômeno convectivo é mais eficiente que a convecção natural e ocorre somente quando existe a indução de um vetor de velocidade de ar sobre um corpo aquecido (HOLMAN, 1981). A preocupação com a manutenção de temperaturas estáveis para animais de laboratório (SLAS, 1989) é justificável pelos efeitos negativos que temperaturas elevadas produzem sobre a produção animal (YAMAUCHI et al., 1967; ZAKEM; ALLISTON, 1974).

Em relação à remoção dos poluentes, a maior preocupação é com a amônia, pois é o principal poluente em biotérios e o mais nocivo aos animais (GAMBLE; CLOUGH, 1976). Raramente, a amônia é encontrada em concentrações consideradas letais (acima de 3.000 ppm) nas salas de animais (De BOER; MORRISON; BRAITHWAITE, 1991). Para poluentes pouco tóxicos, altos níveis ambientais são aceitáveis, contudo, a amônia, em quantidades menores que 10 ppm já causam alteração nos movimentos ciliares da traquéia em ratos (SERRANO, 1971). Lesões no epitélio do trato respiratório ocasionadas pela amônia são frequentemente observadas em ratos e são dependentes da concentração e do tempo de exposição ao gás de amônia (GAMBLE; CLOUGH, 1976). A amônia pode inviabilizar animais para determinados experimentos em virtude das lesões decorrentes de sua ação (CASSEL, LINDSEY; DAVIS, 1981). Além dessas lesões inviabilizarem o animal para trabalhos experimentais, constitui-se em porta de entrada para muitos agentes infecciosos. Broderson, Lindsey e Crawford (1976) demonstraram haver uma relação direta entre os níveis de NH_3 , frequentemente encontrados nas caixas de ratos, e a patogênese da micoplasmose respiratória.

Com o objetivo de melhorar o microambiente, sistemas de ventilação com pressão positiva no interior das caixas foram desenvolvidos com capacidade para

controlar mais eficientemente temperatura, umidade relativa do ar, níveis de amônia, dióxido de carbono e alérgenos (KELLER, MATTINGLY; KNAPE, 1983; WU, JOINER; McFARLAND, 1985; KUROSAWA et al., 1993).

Hoje existem vários modelos de sistemas de ventilação direta que, embora diferentes em sua concepção, possuem características que permitem classificá-los como sistemas de ventilação microambiental (VMA), ou seja, promovem a renovação direta do ar no interior das gaiolas.

Embora alguns desses sistemas VMA já estão sendo comercializados há algum tempo, existem protótipos de sistemas VMA, muitas vezes feitos de forma artesanal, e que permitem testar diferentes condições ambientais, embora não disponíveis no mercado.

Utilizando um desses protótipos, Teixeira et al. (2001a) demonstraram que camundongos obtiveram um aumento de produtividade em relação a camundongos mantidos em um sistema VGD. Estudos histopatológicos demonstraram a redução na incidência de lesões pulmonares nos filhotes nascidos no sistema VMA, atribuída, provavelmente, aos baixos níveis de amônia medidos no interior das caixas no sistema de ventilação microambiental (TEIXEIRA; SOUZA; MERUSSE, 2001b). Chaguri et al. (2001) observaram que ratos acasalados no sistema VMA, com velocidades de ar entre 0,03 e 0,80 m/s, não apresentaram alteração nos índices de fertilidade e sobrevivência. No entanto, produziram ninhadas significativamente maiores e mais uniformes, no nascimento e no desmame, com menor mortalidade de filhotes. Também foi observada a redução dos níveis de amônia em todas as faixas de velocidade utilizadas no sistema VMA em comparação com o biotério convencional. As proles dos casais mantidos no sistema VMA apresentaram menor incidência de lesões pulmonares nas faixas de velocidade utilizadas, notadamente aquelas situadas entre 0,19 e 0,80 m/s.

Indiscutivelmente, o uso de sistemas VMA propicia melhores condições ambientais no microambiente. Uma das conseqüências da utilização desse tipo de ventilação em biotério foi a redução da frequência de troca de cama nas gaiolas, racionalizando o manejo e diminuindo custos em biotérios (CARISSIMI, 1998).

Reeb et al. (1998) estudaram a variação de temperatura, umidade relativa do ar, níveis de amônia e CO₂ em função da frequência de troca de cama do microambiente de caixas com camundongos em um sistema VMA. Com uma taxa de ventilação de 30 trocas de ar/hora, caixas com quatro camundongos adultos, alcançaram níveis de amônia de 10 ppm no sétimo dia sem troca de cama. Entretanto, uma caixa contendo um casal e sua prole necessita uma taxa de 100 trocas de ar/h para manter os mesmos níveis de amônia durante o mesmo período.

Reeb-Whitaker et al. (2001) observaram que camundongos mantidos em um sistema PIV com intervalo de troca de cama de 14 dias não afetaram o desempenho reprodutivo, os níveis de corticosterona plasmáticos, a função imune ou achados histopatológicos no trato respiratório.

O trato respiratório, principalmente a região nasal, torna-se interessante para avaliação de possíveis lesões, pois se constitui na primeira linha de defesa não-imunológica, utilizando-se de mecanismos como a filtração, aquecimento e umidificação do ar (SALDIVA et al., 1992). A utilização de um fluxo de ar unidirecional no interior da caixa sugere o aumento de particulados em suspensão no ar. Estes poderiam agredir mais intensamente a região nasal dos animais pela ação irritativa destes particulados, como pó da ração e da maravalha.

As vias aéreas apresentam um outro importante mecanismo de proteção epitelial que é a secreção de muco (LUNDGREN, 1992). O muco é uma complexa mistura de células, fluido, transudado, proteínas e glicoproteínas sendo produzido por células

especializadas nos brônquios e no epitélio das vias aéreas. Dessa maneira, o estudo das propriedades reológicas do muco possibilita avaliar o meio ambiente nas salas de animais, pois o trato respiratório é um dos sistemas mais agredidos em condições ambientais desfavoráveis. Teixeira et al. (2006) observaram que não houve diferença significativa nas propriedades reológicas de ratos mantidos em sistema VMA e em VGD, sugerindo que não existe maior agressão ao trato respiratório pelo uso de sistemas microventilados.

Estudos morfológicos e histoquímicos realizados nas fossas nasais de ratos expostos à poluição do ar no centro de São Paulo apresentaram evidências de hipertrofia secretória, combinada com um aumento na secreção e dano ciliar (SALDIVA et al., 1992; MACCHIONE et al., 1995). A exposição prolongada a baixos níveis de poluição do ar deteriora as defesas respiratórias contra agentes infecciosos e pode causar um aumento na morbidez respiratória e na mortalidade (LEMOS et al., 1994).

Lamb (1975), já sugeria em seus estudos, que o exame histológico de secções longitudinais das vias aéreas se tornasse parte do controle de qualidade de roedores, uma vez que, considerava impróprios os animais com doença respiratória para qualquer experimento em longo prazo, mesmo para pesquisas que não tenham como foco o trato respiratório ou imunológicas.

Os resultados obtidos até o momento com o sistema VMA foram realizados com ratos e camundongos, porém não existe relato na literatura sobre a manutenção de outras espécies de animais de laboratório em sistemas VMA.

Desta forma, o presente trabalho propõe avaliação morfológica do trato respiratório (traquéia e pulmões) de cobaias mantidas em sistema microventilado (sistema VMA) e do padrão radiológico pulmonar dos animais, visando contribuir com a viabilidade do sistema VMA na manutenção destes animais em biotérios.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar a incidência de lesões na traquéia e nos pulmões de cobaias mantidas por 180 dias nos sistemas de ventilação para conforto (VGD) e microambiental (VMA).

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar a incidência de lesões na traquéia e nos pulmões por meio de avaliação qualitativa (escores) em função do tipo de condição de alojamento que os animais foram expostos.
- Correlacionar os achados histopatológicos com a avaliação radiológica dos pulmões nos animais dos grupos controle (sistema de ventilação para conforto) e experimental (sistema de ventilação microambiental).
- Comparar os achados histopatológicos dos pulmões e traquéia dos machos e fêmeas mantidos nos sistemas VGD e VMA.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Animais

Trinta e seis cobaias (*Cavia porcellus*), da linhagem Duncan-Hartley, de padrão sanitário convencional, machos e fêmeas, com 21 dias de idade no início dos experimentos, provenientes do Criatório Particular de Animais Brusco, situado em Concórdia/SC, foram utilizadas para a realização do trabalho.

4.2 - Local

Os animais foram mantidos no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), órgão auxiliar do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais, em número de 36, foram mantidos em gaiolas plásticas (de polipropileno), nas medidas 90 x 60 x 30 cm, com cama de maravalha de madeira de cor clara, previamente autoclavada. Água e ração comercial para coelhos foram fornecidas em regime “*ad libitum*”. A dieta era suplementada diariamente com fornecimento de vegetais frescos (repolho ou couve, conforme disponibilidade e preço) visando o aporte de vitamina C para os animais. As cobaias foram manipuladas e tratadas conforme normas nacionais e internacionais de cuidados de animais de laboratório, em especial as do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2005) e do *Institute for Laboratory Animal Research* (ILAR, 1996).

4.3 - Cama

A cama utilizada foi a maravalha obtida de madeira de cor clara, adquirida de fornecedor comercial (SM Madeireira, Pelotas/RS), autoclavada antes do uso. Para ambos grupos foi estabelecido um volume padrão de maravalha por caixa, de cerca de

2000 cm³(centímetros cúbicos), que correspondeu a uma altura de 30mm de cama para os animais. As trocas de cama foram realizadas duas vezes por semana, com intervalos de três e quatro dias, para todos grupos estudados.

4.4 - Fotoperíodo

Os animais foram mantidos em fotoperíodo claro/escuro, alternados a cada 12 horas, com emprego de um aparelho tipo “timer” (Timer HASA 207®).

4.5 - Sistemas de ventilação

4.5.1 - Sistema de ventilação para conforto (VGD)

Os animais pertencentes ao grupo controle foram mantidos no CREAL-ICBS-UFRGS em uma sala (dimensões de 3,0 x 2,80 x 2,88 metros), provida com um sistema de ventilação/exaustão de acordo com os princípios da ventilação para conforto (VGD) (ASHRAE, 1997). Na prática, ocorre a insuflação de ar novo por meio de um conjunto motor/ventilador centrífugo e o produto da mistura do ar novo com o existente na sala é removido por um exaustor.

4.5.2 - Protótipo de sistema de ventilação microambiental (VMA)

Esse sistema (Figura 1) foi confeccionado com perfil metálico, com capacidade para quatro gaiolas e montado sob a forma de uma estante, com modificações em relação ao modelo proposto por Merusse (1995) para camundongos. A insuflação e exaustão foram realizadas por meio de conjuntos motores/ventiladores, tipo siroco, ligados aos respectivos dutos. A distribuição e captação do ar na estante foram feitas por dutos dispostos longitudinalmente no plano superior da estante. Conectados aos dutos,

microventiladores promoviam um fluxo de ar unidirecional descendente para o interior da gaiola, possibilitando a renovação direta do ar no interior da gaiola. A retirada do ar foi feita por exaustão, sendo feito o expurgo deste ar para o ambiente.



Figura 1 – Protótipo do sistema de ventilação microambiental (VMA)

4.6 - Tempo de alojamento

Cada grupo de animais foi mantido num período de 180 dias em cada sistema de ventilação.

4.7 - Eutanásia

No final dos experimentos, 10 animais (5 fêmeas e 5 machos) do grupo controle e 8 animais (4 fêmeas e 4 machos) do grupo experimental, foram eutanasiados e necropsiados para coleta dos materiais. A seleção dos animais foi aleatória, haja vista que nenhum animal apresentava sinais clínicos de doença respiratória.

A eutanásia foi realizada pela administração de tiopental sódico, via intraperitoneal, na dose de 50 mg/kg, seguida da administração de 5ml de cloreto de

potássio a 10%, pela via intraperitoneal. Esta técnica de eutanásia é recomendada pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária para roedores (CFMV, 2002).

4.8 – Coleta de material da traquéia e pulmões

Após confirmação da morte do animal, a pele na região cervical ventral era divulsionada com auxílio de pinça e tesoura de dissecação, a musculatura era afastada e procedia-se a retirada de um fragmento proveniente de um corte transversal da traquéia. Imediatamente após a retirada, o material era armazenado em uma solução de formol tamponado a 10%. Posteriormente era realizada a abertura da cavidade torácica para coleta dos pulmões. O processamento das amostras ocorreu no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo empregada como rotina a coloração hematoxilina-eosina para as preparações de traquéia e de pulmões.

4.9 – Avaliação qualitativa de traquéia e pulmões

Para avaliação das lesões foram observados aleatoriamente três campos microscópicos em cada preparação (uma lâmina de pulmão e uma lâmina de traquéia por animal) e atribuídos escores de acordo com a intensidade das lesões encontradas nas preparações de traquéia e de pulmões. Para as alterações encontradas foram atribuídos escores: grau I - discreto (sem lesões ou com lesões até 25% do campo), grau II - moderado (lesões de 25 a 50% do campo), grau III - intenso (lesões de 50 a 75 % do campo) e grau IV-grave (lesões de 75 a 100% do campo).

4.10 - Sistema de captura de imagem

Após a avaliação dos campos em cada preparação histológica, as imagens foram armazenadas em formato de arquivo para fins de documentação e para posteriores estudos morfométricos. Para tanto, o microscópio óptico utilizado possuía uma câmera de vídeo integrada onde a imagem era capturada e transferida para um microcomputador.

4.10.1 - Hardware

O sistema de captura de imagem utilizado foi o disponível no setor de Animais de Laboratório da Faculdade de Veterinária (UFRGS). O sistema era composto por um microscópio trinocular da marca Nikon modelo Eclipse E200 no qual foi conectado uma câmera CCD da marca Sony® modelo SSC-DC14 *Hyperhad*, com resolução de 420 linhas (Figura 2). A imagem capturada era transferida para um computador AMD 500 MHz, com memória RAM de 512 *Megabytes* equipado com placa de Rádio/Tv/captura, marca Pixelview®, modelo PV-BT878P+ w/FM.

4.10.2 - Softwares utilizados

4.10.2.1 - Software de captura

Após a escolha do campo microscópico, sua imagem era transferida ao computador e visualizada no programa *Pixelview Station* v. 4.29TV fornecido pelo fabricante da placa de captura (Figura 3). A seguir, a imagem era armazenada em formato de intercâmbio de arquivos (formato JPEG).



Figura 2 – Parte do sistema de captura de imagem (microscópio e câmera). Faculdade de Veterinária – UFRGS. 2007



Figura 3 – Tela do programa *Pixelview Station v. 4.29TV* em uso.

4.11 - Exame radiológico

Os exames radiológicos foram realizados no Setor de Radiologia do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS.

Os animais eram trazidos do biotério em horários fora do expediente normal do hospital a fim de minimizar um possível estresse, caso se deparassem com cães, gatos ou outros pacientes do HCV. Em virtude da docilidade dos animais não foi necessária a sedação em nenhuma das tomadas radiográficas para realização dos exames.

Estes exames foram realizados no dia inicial do experimento (dia 0) e após 45, 90, 135 e 180 dias do experimento.

Os animais eram posicionados sobre o écran em decúbito ventral para a primeira projeção radiológica com incidência ventro-dorsal. Após o animal era posicionado em decúbito lateral, e com o écran abaixo do corpo se realizava a segunda projeção radiológica, denominada látero-lateral.

A carga utilizada constituía de 12 de kilovoltagem por 48 de miliamperagem, para posição ventro dorsal e 12 de kilovoltagem por 46 de miliamperagem para a posição látero-lateral.

Durante o experimento os animais submetidos ao exames radiológicos eram identificados, porém apenas ao final do experimento foi realizada a comparação com os exames radiológicos obtidos anteriormente.

A avaliação da presença de lesões seguiu uma escala onde o grau 0 significou ausência de alterações radiológicas no exame. O grau 1 ou regular foi considerado quando existiam sinais de leve infiltrado bronquial, o grau 2 foi atribuído quando havia infiltrado no parênquima pulmonar. O grau 3 foi atribuído a infiltração de parênquima pulmonar difuso, com marcada infiltração peribronquial.

4.12 - Delineamento Experimental

4.12.1 - Grupos

Os animais foram reunidos em quatro grupos:

- **VGD-M:** grupo controle composto por 12 machos mantido sob sistema de ventilação para conforto conforme descrito no item 4.5.1.
- **VMA-M:** grupo experimental composto por 8 machos mantidos sob sistema de ventilação microambiental conforme descrito no item 4.5.2.
- **VGD-F:** grupo controle composto por 12 fêmeas mantidas sob sistema de ventilação para conforto conforme descrito no item 4.5.1.
- **VMA-F:** grupo experimental composto por 8 fêmeas mantidas sob sistema de ventilação microambiental conforme descrito no item 4.5.2.

4.13 - Análise estatística

O teste Mann-Whitney foi empregado para analisar as possíveis diferenças entre as médias dos escores atribuídos na avaliação qualitativa da traquéia e pulmões. Estabeleceu-se o valor de 0,05 como nível de rejeição da hipótese de nulidade (p). Foi realizada a comparação entre as fêmeas mantidas sob os sistemas de VMA e VGD, bem como a comparação entre os machos mantidos sob os sistemas de VMA e VGD.

O teste de ANOVA-Friedman foi utilizado para analisar as possíveis diferenças entre os escores atribuídos às lesões encontradas nos exames radiológicos.

5 - RESULTADOS

5.1 - Avaliação por escore de pulmões

A análise histopatológica dos pulmões foi realizada através da avaliação por escores onde foram atribuídos graus de acordo com a intensidade das lesões encontradas (descrita no item 4.9). A presença e intensidade dessas lesões variaram de acordo com o sistema de ventilação. Considerando os dados apresentados na Tabela 2 e representados na Figura 4, as fêmeas do grupo controle VGD-F apresentaram significativamente mais lesões que as fêmeas do grupo experimental VMA-F. Nos machos, embora o grupo VGD-M apresentou uma maior incidência de lesões pulmonares em valores absolutos do que o grupo VMA-M, essa diferença não foi estatisticamente significativa. As lesões predominantes, encontradas nos fragmentos de pulmões analisados, foram de peribronquite crônica, pneumonia intersticial (este tipo de lesão apenas em animais dos grupos VGD-M e VGD-F e representada na figura 5), hiperplasia linfóide peribronquiolar, enfisema e áreas de infiltração de mononucleares predominando neutrófilos (Figura 6),

Tabela 1– Avaliação histopatológica de pulmões de cobaias mantidas nos sistemas de ventilação para conforto (VGD) e microambiental (VMA). Porto Alegre, 2007.

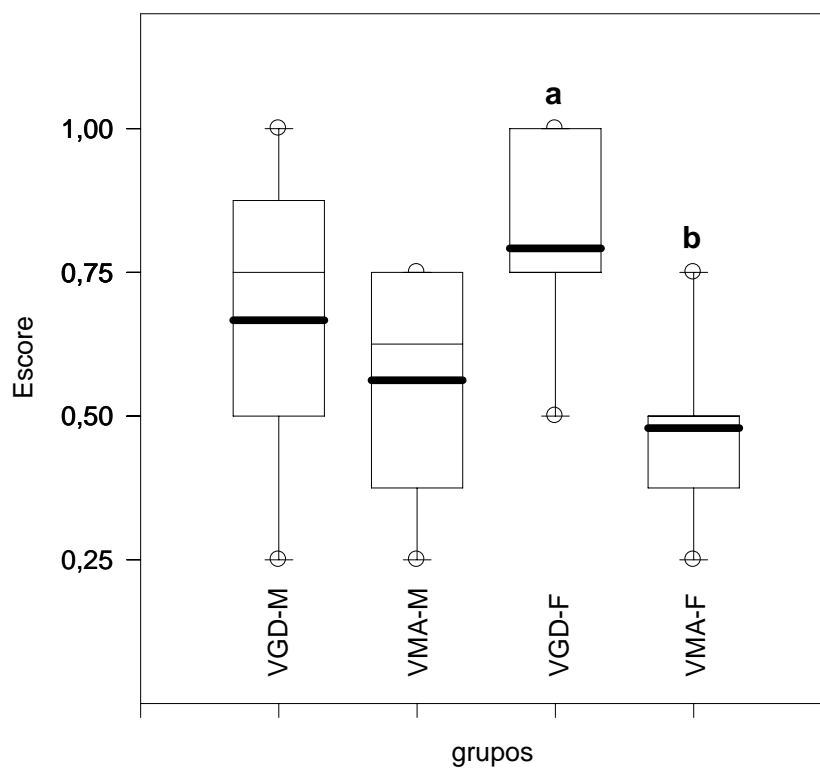
GRUPOS	ESCORES			
	N ^a	média	mediana	percentil
VGD-M	36	0,67 ± 0,27	0,75	0,25-1,00
VMA-M	24	0,56 ± 0,22	0,75	0,25-0,75
VGD-F	36	0,79 ± 0,18 ^a	0,75	0,50-1,00
VMA-F	24	0,48 ± 0,17 ^b	0,50	0,25-0,75

Grau I - discreto (sem lesões ou com lesões até 25% do campo); Grau II - moderado (lesões de 25 a 50% do campo); Grau III - intenso (lesões de 50 a 75 % do campo); Grau IV-grave (lesões de 75 a 100% do campo).

^a Número de campos microscópicos examinados em cada grupo

Os dados estão expressos em mediana dos escores atribuídos as lesões encontradas nos campos microscópicos especificados para cada grupo.

a,b diferença significativa para teste de Mann-Whitney $p < 0,05$.



* **a,b** diferença significativa para $p < 0,05$ teste “U” de Mann-Whitney.

Figura 4 – *Boxplots* dos escores de avaliação histopatológica dos pulmões de cobaias fêmeas (F) e machos (M) mantidos sob os sistemas de ventilação microambiental (VMA) e ventilação para conforto (VGD).

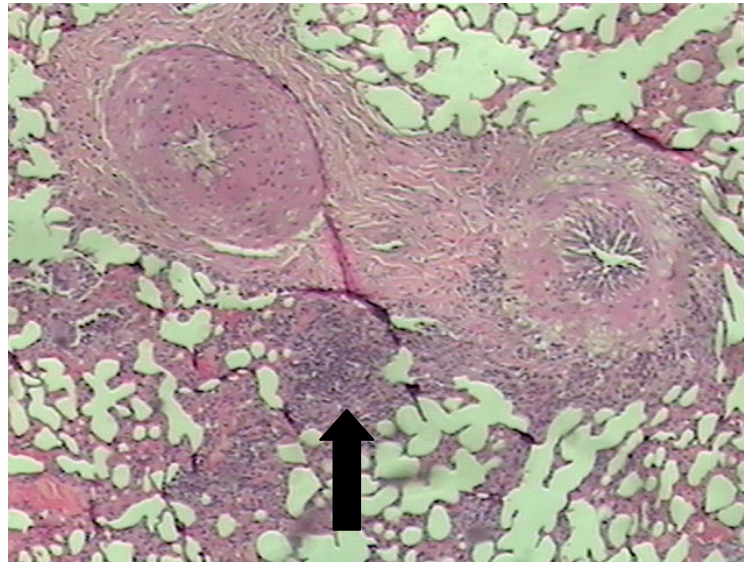


Figura 5 – Pneumonia intersticial, presença de infiltrado inflamatório no pulmão de cobaia fêmea, mantida sob sistema VGD. HE 20X

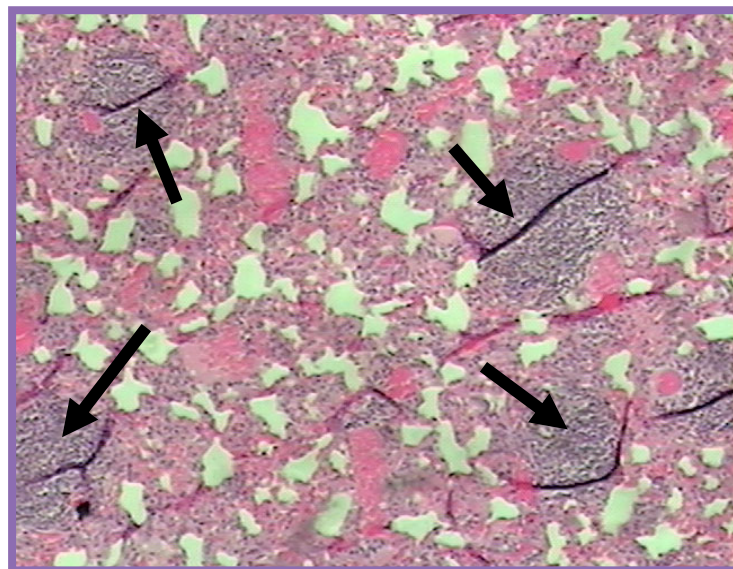


Figura 6 – Núcleos de infiltrados inflamatórios no pulmão de cobaia macho, mantida sob sistema VMA. HE 20X.

5.2 -Avaliação por escore de traquéia

A análise histopatológica da traquéia foi realizada através da avaliação por escores, estes receberam graus de acordo com a intensidade das lesões encontradas (descritas no item 4.9). A presença e intensidade dessas lesões variaram de acordo com o sistema de ventilação. Considerando os dados apresentados na Tabela 2 e representados na Figura 7, os machos do grupo controle (VGD-M) apresentaram significativamente mais lesões que os machos do grupo experimental (VMA-M). Da mesma forma, quando comparadas as fêmeas dos grupos VGD-F e VMA-F, as primeiras (VGD-F) apresentaram significativamente mais lesões que as fêmeas do grupo experimental (VMA). A lesão predominante, encontrada nos fragmentos de traquéia analisados, foi de descamação do epitélio (Figura 8), com evidente perda de cílios (Figura 9) associada a metaplasia do epitélio.

Na comparação entre machos e fêmeas do mesmo sistema de ventilação, observam-se escores médios similares dentro do mesmo sistema, sendo menores nos animais mantidos em sistema VMA e maiores nos animais mantidos no sistema VGD.

Tabela 2 – Avaliação histopatológica por escores de traquéia de cobaias mantidas sob os sistemas de ventilação para conforto (VGD) e microambiental (VMA). Porto Alegre, 2007.

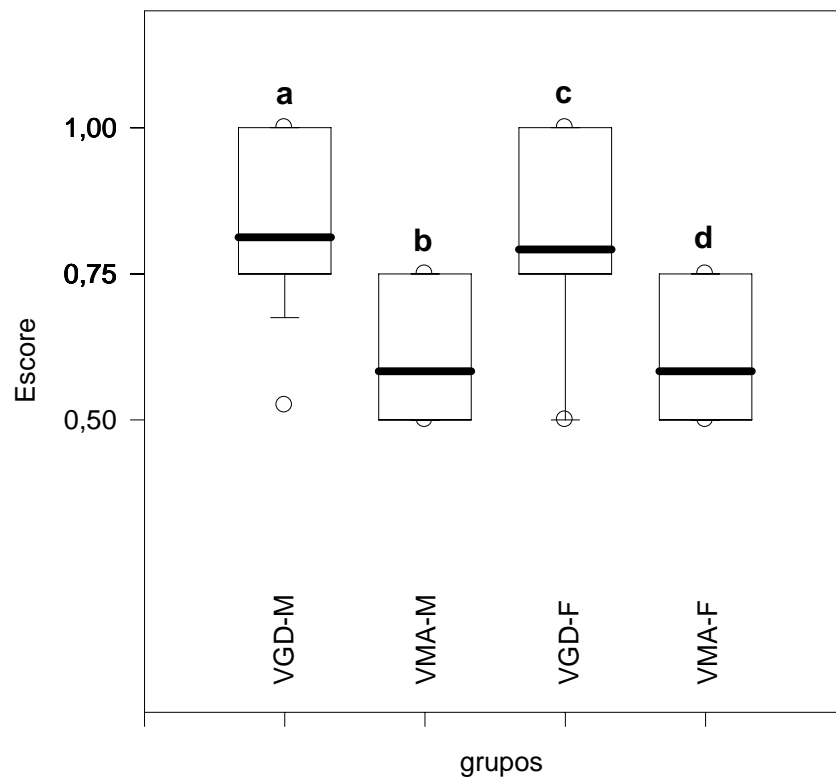
GRUPOS	ESCORES DE TRAQUÉIA			
	N ^a	média	mediana	percentil
VGD-M	36	0,81 ± 0,16 a	0,75	0,50-1,00
VMA-M	24	0,58 ± 0,12 b	0,50	0,50-0,75
VGD-F	36	0,79 ± 0,18 c	0,75	0,50-1,00
VMA-F	24	0,58 ± 0,12 d	0,50	0,50-0,75

Grau I - discreto (sem lesões ou com lesões até 25% do campo); Grau II - moderado (lesões de 25 a 50% do campo); Grau III - intenso (lesões de 50 a 75 % do campo); Grau IV - grave (lesões de 75 a 100% do campo).

^a Número de campos microscópicos examinados em cada grupo

Os dados estão expressos em mediana dos escores atribuídos as lesões encontradas nos campos microscópicos observados em cada grupo.

a , b e c, d diferença significativa para teste de Mann-Whitney $p < 0,05$.



a,b e *c,d* diferença significativa para teste de Mann-Whitney $p < 0,05$.

Figura 7 – *Boxplots* dos escores de avaliação histopatológica da traquéia de cobaias fêmeas (F) e machos (M) mantidos sob os sistemas de ventilação microambiental (VMA) e ventilação para conforto (VGD).



Figura 8 - Perda de cílios e presença de metaplasia no epitélio da traquéia de cobaia macho mantido sob sistema VGD. HE 40X.

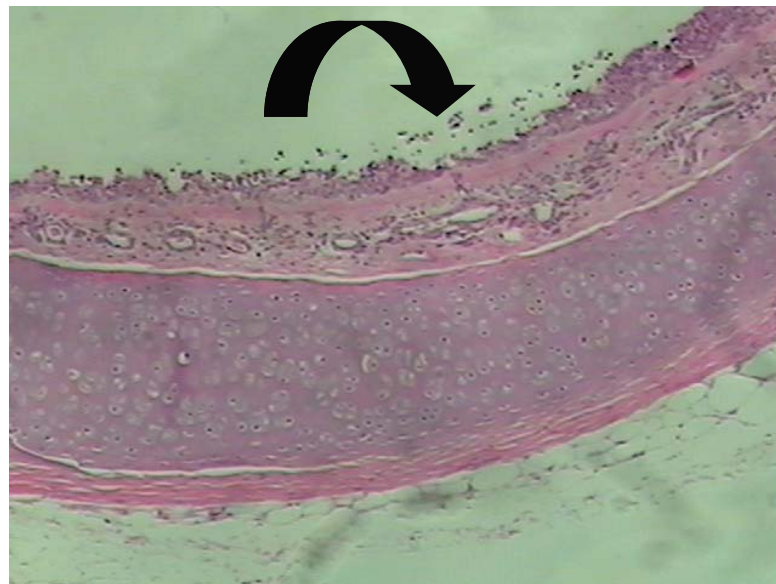


Figura 9 – Descamação do epitélio e metaplasia da traquéia de cobaia fêmea mantida sob sistema VMA. HE 20X

5.3 – Avaliação radiológica

Os resultados obtidos através de exames radiológicos realizados periodicamente, (como descrito no item 4.11), são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Escores médios da avaliação radiológica nos dias zero, 45, 90, 135 e 180 de experimentação. Porto Alegre, 2007.

DIAS	ESCORES			
	Machos		Fêmeas	
	VGD-M	VMA-M	VGD-F	VMA-F
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
45	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
90	0,80 ± 0,45	0,60 ± 0,58	0,60 ± 0,55	0,20 ± 0,45
135	1,40 ± 0,55	1,20 ± 0,82	1,60 ± 0,55	1,20 ± 0,45
180	2,20 ± 0,84	2,00 ± 0,82	2,40 ± 0,55	2,20 ± 0,45

Escores foram atribuídos conforme especificado no item 4.11, onde grau 0 significa ausência de alterações radiológicas no exame, grau 1 quando na presença de sinais de leve infiltrado bronquial, grau 2 quando na presença de infiltrado no parênquima pulmonar e grau 3 quando na presença de infiltração de parênquima pulmonar difuso, com marcada infiltração peribronquial.

Os dados estão expressos em média ± desvio-padrão dos escores atribuídos as lesões encontradas nos exames radiológicos de cinco animais por grupo

Teste de ANOVA - Friedman $p < 0,05$.

As avaliações radiológicas realizadas no dia inicial e após 45 dias do início do experimento tanto no grupo do sistema VGD quanto no grupo de animais pertencentes ao sistema VMA não apresentaram nenhuma alteração no padrão radiológico pulmonar das cobaias submetidas ao exame.

As lesões pulmonares apresentadas na avaliação dos exames radiológicos feitos a partir do 90º dia nos animais mantidos sob os sistema de ventilação VGD e VMA foram as mesmas, não houve diferença significativa na intensidade das lesões pulmonares entre os animais dos dois grupos e na comparação entre machos e fêmeas. Este fato foi comprovado pela análise estatística (Teste de ANOVA-Friedman).

As lesões pulmonares de maior intensidade foram percebidas a partir dos exames radiológicos realizados no 135º dia. A avaliação das películas radiológicas demonstrou lesões de diferentes tipos: leves infiltrados bronquiais, mais abundantemente nos animais avaliados no 90º dia, lesões no parênquima pulmonar, nas quais houve perda geral de contraste nos campos pulmonares pelo aumento de opacidade dos tecidos intersticiais e lesões de padrão pulmonar intersticial difuso, nas quais os infiltrados pulmonares possuem geralmente uma distribuição em forma de manchas, com margens irregulares indistintas. As alterações radiológicas dos pulmões ficam evidenciadas nas Figuras 11 e 12.

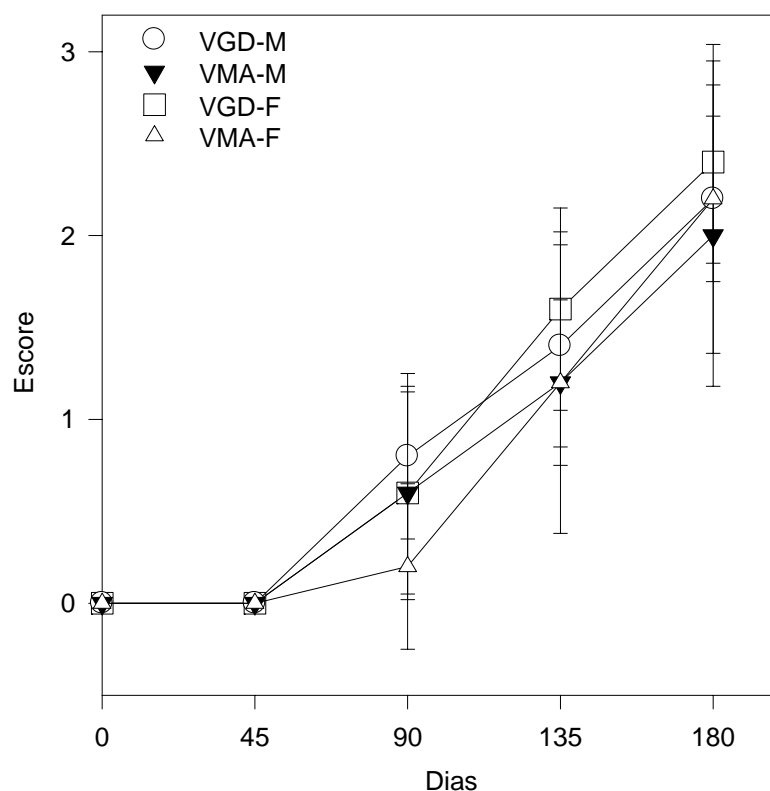


FIGURA 10 – Representação gráfica dos valores médios da avaliação radiológica periódica, tendo em vista o padrão pulmonar de cobaias sob sistemas de ventilação para conforto (VGD) e microambiental (VMA).



Figura 11 - Exames radiológicos realizados na posição látero-lateral de pulmão de cobaias sob sistema VGD. A esquerda um macho com 90 dias e grau 2 de lesões e a direita, uma fêmea com 135 dias e grau 3.



Figura 12 - Exames radiológicos realizados na posição látero-lateral de pulmão de cobaias sob sistema VMA. A esquerda um macho com 90 dias e grau 1 de lesões e a direita, uma fêmea com 135 dias e grau 2.

6 - DISCUSSÃO

Nos últimos dez anos, vários trabalhos foram realizados com o objetivo de avaliar a aplicabilidade dos sistemas de ventilação microambiental (VMA) e seus resultados sobre o controle ambiental e nos animais alojados sob este tipo de sistema (MERUSSE, 1995; TEIXEIRA et al., 1999, TEIXEIRA, 2000; CARISSIMI et al., 2000; CHAGURI et al., 2001). Esses trabalhos, em sua maioria, compararam respostas dos animais alojados sob o sistema VMA e animais mantidos sob o sistema de ventilação para biotérios, de uso consagrado, como é o sistema de ventilação para conforto (VGD).

A diferença conceitual de projeto entre estes dois tipos de ventilação faz com que o sistema VMA seja de baixo custo, de fácil manutenção e, principalmente, possibilita maior renovação de ar no interior das gaiolas quando comparado com o sistema VGD (MERUSSE, 1995; CARISSIMI, 1998).

Por si só, as vantagens econômicas e tecnológicas do sistema VMA não justificariam esta nova abordagem para controle ambiental em biotérios se os animais não demonstrassem respostas favoráveis.

Dessa maneira, os trabalhos desenvolvidos até o momento caracterizaram-se por avaliar variáveis que pudessem corroborar com a aplicabilidade do sistema VMA através das respostas dos animais.

Atualmente sabe-se que ratos e camundongos mantidos em sistema VMA apresentam menor incidência de lesões pulmonares, maior integridade epitelial na epiglote e traquéia, apresentam muco com propriedades reológicas similares aos animais mantidos sob o sistema VGD, não possuem qualquer indicativo de alteração comportamental e em certas condições possuem desempenho reprodutivo superior aos

animais alojados sob o sistema VGD (TEIXEIRA et al., 1999, TEIXEIRA et al., 2001b; CARISSIMI et al., 2000). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as lesões no trato respiratório, (traquéia e pulmões) de outra espécie convencional na experimentação: a cobaia (*Cavia porcellus*). Dois grupos foram colocados em dois ambientes diferentes (20 animais no sistema de VGD e 16 animais no sistema de VMA), tendo sido acompanhados por meio de exames radiológicos periódicos (intervalo de 45 dias).

Em relação à avaliação radiológica, em nosso estudo, não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre as lesões avaliadas no exame radiológico dos animais sob os sistemas VGD e VMA. Em nenhum dos grupos no período de 45 dias houve lesão pulmonar visível radiologicamente apenas após a terceira avaliação radiológica (correspondente a 90 dias de experimento) é que alguns animais apresentaram lesões infiltrativas leves no parênquima pulmonar. Ambos os grupos apresentaram animais com infiltrados severos no parênquima pulmonar (convencionado grau 3) ao serem avaliados através do exame radiológico no último dia do experimento.

As avaliações histopatológicas da traquéia demonstraram diferença estatisticamente significativa entre as fêmeas sob sistema VGD e VMA, estas últimas apresentaram menos lesões que as outras. Também entre os machos houve diferença significativa nas lesões da traquéia sendo que os animais pertencentes ao grupo sob sistema VGD apresentaram mais lesões que os animais pertencentes ao grupo sob sistema VMA. Desta forma, estes resultados concordaram com trabalhos anteriores no qual ratos mantidos sob sistemas VMA apresentaram menor intensidade de lesões no septo nasal e traquéia do que animais mantidos sob VGD (BAIALARDI, 2003). De acordo com Carissimi et al. (2000) uma menor prevalência de lesões na traquéia de ratos mantidos no sistema de ventilação microambiental (VMA) pode ser decorrente da

diminuição de poluentes no microambiente ocasionada pela exaustão do sistema microambiental.

Na avaliação histopatológica dos pulmões de animais mantidos sob dois sistemas de ventilação ambiental as fêmeas pertencentes ao grupo sob sistema VGD apresentaram uma maior intensidade de lesões que as fêmeas pertencentes ao grupo sob sistema VMA. No grupo de machos sob sistema VGD houve mais lesões que sob animais mantidos no sistema de VGD, porém esta maior intensidade de lesões não apresentou significância estatística.

Em relação às lesões nos pulmões dos machos sob sistema VMA serem mais intensas que no sistema VGD, o que representa um resultado diferente do esperado, pode-se supor que este fato esteja relacionado à posição destes animais na estante metálica do sistema de VMA. Estes animais ficavam na parte superior da estante mais perto do sistema de ventilação. O ar proveniente das trocas pode ter provocado um turbilhão de micropartículas que foram aspiradas pelas cobaias iniciando um processo de lesão pulmonar que foi cronificando com o passar do tempo do experimento.

Apesar deste dado não ser satisfatório do ponto de vista da sanidade destes animais não podemos descartar o uso sistema de VMA, necessitando um maior estudo da criação de uma proteção contra a incidência direta do ar proveniente da ventilação nestes animais.

7 - CONCLUSÕES

Os resultados, obtidos no presente trabalho, permitem as seguintes conclusões:

1- A incidência de lesões na traquéia e pulmões de cobaias fêmeas mantidas por 180 dias sob o sistema de ventilação para conforto (VGD) foi maior do que as mantidas sob o sistema de ventilação microambiental (VMA). Da mesma forma, a intensidade das lesões de traquéia e pulmões de cobaias machos foi maior no grupo mantido sob o sistema de ventilação VGD.

2- Por meio da avaliação radiológica, não houve diferença significativa na intensidade das lesões encontradas nos pulmões de cobaias mantidas sob os sistemas VGD e VMA. Sendo assim, não houve correlação entre a intensidade das lesões histopatológicas e as imagens radiológicas pulmonares de cobaias mantidas por 180 dias sob ambos os sistemas de ventilação.

3- Com relação ao gênero, não houve diferença significativa na avaliação histopatológica da traquéia, mas na histopatologia pulmonar, apesar do grupo de machos mantidos sob o sistema VGD ter apresentado maior intensidade de lesões, estas, não atingiram significância estatística como no grupo das fêmeas.

Enfim, conclui-se que o sistema de microventilação (VMA) apresentou-se como melhor do que o sistema para o conforto (VGD), na avaliação morfológica do trato respiratório de cobaias (*Cavia porcellus*).

REFERÊNCIAS

- ALSCHULER, J.H. Air treatment for research animal housing. **Laboratory Animal Care**, v. 13, n. 3, p. 321-31, 1963.
- ANDERSON, N.L. Criação e Medicina Básicas dos Animais de Estimação “de Bolso”. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. cap.10, p.1523 -1552.
- ASHRAE, American Association of heat, refrigerating and air conditioning engineering. **ASHRAE Transactions**, v. 78, n. 10, 1997.
- BAIALARDI, C. **Avaliação de padrões morfológicos e funcionais do epitélio respiratório superior de ratos (*Rattus norvegicus*) mantidos em diferentes sistemas de ventilação**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). 76 p. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- BRODERSON, J.R.; LINDSEY, R.J.; CRAWFORD, J.E. The role of environmental ammonia in respiratory mycoplasmosis of rats. **American Journal of Pathology**, v. 85, p. 115-127, 1976.
- CARISSIMI, A.S. Manutenção de ratos (*Rattus norvegicus*) em sistemas de ventilação microambiental com diferentes intervalos de trocas de cama: aspectos sanitários e econômicos. Tese (doutorado). 88 p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. 1998.
- CARISSIMI, A.S. et al. Effects of two ventilation systems and bedding change frequency on cage environmental factors in rats (*Rattus norvegicus*). **Animal Technology**, v. 51, n. 3, p. 161 – 170, 2000.
- CASSEL, G.H.; LINDSEY, J.R.; DAVIS, J.K. Respiratory and genital mycoplasmosis of laboratory rodents: implications for biomedical research. **Israel Journal of Medical Science**, v. 17, n.7, p. 548-54, 1981.
- CCAC – CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guide to the care and use of experimental animals**. Ontario, 1980, v.1, p. 15-22.
- CHAGURI, L.C.A.A. et al. Evaluation of reproductive indices in rats (*Rattus norvegicus*) housed under na intracage ventilation system. **Contemporary Topics**, v. 40, n. 5, p. 25-30, 2001.
- CLARK, J.D.; RAGER, D.R.; CALPIN, J.P. Animal well-being 1. General considerations. **Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 6, p. 564-570, 1997.
- COBEA – COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Princípios Éticos da Experimentação Animal (1991)**, disponível em < <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3> > Acesso em 10/05/2005.
- CFMV – CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução Nº 714, de 20 de Junho de 2002. **Procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências**. DOU 21-06-02, 2002.
- De BOER, S.; MORRISON, W.D.; BRAITHWAITE, L.A. Effects of environmental quality in livestock buildings on swine health and productivity: a literature review. **ASHRAE Transactions: Symposia**. v. 97, parte 2, p. 511-8, 1991.

- EGAN, B.J.; BUTLER, E.J. Controlled environment systems for experimental animals. II. A unidirectional air flow tent. **Laboratory Animals**, v. 6, p.119-25, 1972.
- GAMBLE, M. R. & CLOUGH, G. Ammonia build-up in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium. **Laboratory Animals**, v.10, p. 93-104, 1976.
- HARKNES, J.E.; WAGNER, J. E. **The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents**. Filadélfia: Lea & Febiger, 1989.250p.
- HAWK,C.T; LEARY,S.L.**Formulary for Laboratory Animals**, Iowa State University Press, Ames, 1995.
- HILLVER, E.V.; QUESENBERRY. K.E. **Ferrets, Rabbits and Rodents. Clinical Medicine and Surgery**. Filadélfia: WB Saunders. 1997. 414 p.
- HOLMAN, J.P. **Heat Transfer**. MacGraw-Hill: Filadélfia. 1981. 349p.
- ILAR – INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Animal Environment, Housing, and Management. **ILAR**. Washington, D. C., National Academy Press, 1996, p. 21-55.
- KELLER, G.L.; MATTINGLY, S.F. KNAPE, Jr, F.B. A forced-air individually ventilated caging system for rodents. **Laboratory Animal Science**, v. 33, n.6, p. 580-2, 1983.
- KUROSAWA, T.et al. Invention of air forced ventilated micro-isolation cage and rack system – environment within the cages: ventilation, air flow. **Experimental Animals**, v. 42, n. 4, p. 547-557, 1993.
- LAMB, D. Rat Lung Pathology and Quality of Laboratory Animals: The User's View. **Laboratory Animals** v. 9, p. 1-8, 1975.
- LANE-PETTER, W. A Ventilation barrier to the spread of infection in laboratory colonies. **Laboratory Animals**, v.4, p. 125-34, 1970.
- LEMOS, M. et al.Quantitative Pathology of Nasal Passages in Rats Exposed to Urban Levels of Air Pollution. **Environmental Research** 66, p.87-95, 1994.
- LUNDGREN, J.D. Mucus production in the lower airways: a review of experimental studies. **Danish Medical Bulletin**, v. 39, supp. 4, p. 289-303, 1992.
- MACCHIONE, M. et al. Rheological determinants of mucociliary transport in the nose of the rat. **Respiration Physiology**, v. 99, p. 165-172, 1995.
- MACINTYRE, A.J. **Ventilação Industrial e Controle da Poluição**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1990. C. 1, p. 1-3; c.3, p.26-36; c.7, p.92-104.
- MERUSSE, J.L.B. Equipamento para Criação e Manutenção de Animais Utilizados em Experimentação Biomédica e Respectivo Processo de Distribuição Unidirecional do Ar. **Revista de Propriedade Industrial**, n. 1262, p. 28, 1995.
- MUNKELT, F.H. Odor control in animal laboratories. **Heating Piping and Air Conditioning**, v. 10, p. 289-91, 1938.
- OPAS – ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Animales de laboratório. **Guia para Instalaciones y Cuidado de Animales de Laboratório**. Washington, 1968, p. 1-54.
- QUINTON, J.F. **Novos Animais de Estimação: pequenos mamíferos**. São Paulo: Editora Rocca, 2005. 263p.

REEB, C.K. et al. Microenvironment in ventilated animal cages with differing ventilation rates, mice populations, and frequency of bedding changes. **Contemporary Topics**, v. 37, n. 2, p. 43-49, 1998.

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

RYLANDER, R.; HELLSTRÖM, P.A. Versatile cage for environmental protection housing of research animals. **Laboratory Animal Science**, v. 23, n.5, p. 876-9, 1973.

SALDIVA, P.H.N. et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. **Environmental Research**, v. 57, p. 19-33, 1992.

SERRANO, L.J. Carbon dioxide and ammonia in mouse cages: effect of cage covers, population and activity. **Laboratory Animal Science**, v. 21, p. 75-85, 1971.

SLAS – SOCIETY FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE. Committee on training and correct housing of laboratory animals. **On the planning and structure of animal facilities for institutes performing animal experiments**. 2 ed. Basel, 1989, p. 39-48.

TEIXEIRA, M.A. et al. Microenvironmental Ventilation System for Laboratory Animals facilities with air distribution by means of plenum Chambers. **Animal Technology**, v. 50, n. 3, p. 187-194, 1999.

TEIXEIRA, M. A. et al. Hematological and biochemical profiles of rats (*Rattus norvegicus*) kept under microenvironmental ventilation system. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo-SP, v. 37, n. 5, p. 341-347, 2000.

TEIXEIRA, M.A. et al. Reduction of atmospheric ammonia and incidence of pulmonary lesions in mice kept in plenum chamber microenvironmental ventilation system. **Scand. J. Lab. Anim. Sci.**, n° 3, vol. 28; 2001^a.

TEIXEIRA, M. A.; SOUZA, N. L.; MERUSSE, J. L. B. Mice (*Mus domesticus domesticus*) productivity in a microenvironmental ventilation system using plenum chambers. **Animal Technology and Welfare**, Londres, v. 52, n. 3, p. 233-242, 2001^b.

TEIXEIRA, M. A. et al. Effects of an individually ventilated cage system on airway integrity of rats (*Rattus norvegicus*) in a laboratory in Brazil. **Laboratory Animals** (London), Londres, v. 40, p. 419-431, 2006.

TERRIL, L.A.; CLEMONS, D.J. **The Laboratory Guinea Pig**, Flórida: CRC Press, 1998. 168 p.

VAN DER WAAIJ, A.D.; ANDREAS, A.H. Prevention of airborne contamination and cross-contamination in germ-free mice by laminar flow. **Journal of Hygiene**, v. 69, p. 83-9, 1971.

WU, D.; JOINER, G.N.; McFARLAND, A.R. A forced-air ventilation system for rodent cages. **Laboratory Animal Science**, v. 35, n. 5, p. 499-504, 1985.

YAMAUCHI, C. et al. Influence of environmental temperature on acute toxicity in laboratory mice. **Bulletin of the Experimental Animals**, v.16, p. 3-8, 1967.

ZAKEM, H.B.; ALLISTON, C.W. The effects of noise level and elevated ambient temperatures upon selected reproductive traits in female Swiss-Webster mice. **Laboratory Animal Science**, v. 24, n. 3, p. 469-75, 1974.