

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

**Avaliação de padrões morfológicos e funcionais do epitélio respiratório superior de ratos (*Rattus norvegicus*) mantidos em diferentes sistemas de ventilação.**

**Autora: Carmem Elza Giordano Baialardi  
Orientador : Prof. Dr. André Silva Carissimi**

**Porto Alegre**

**2003**

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

**Avaliação de padrões morfológicos e funcionais do epitélio respiratório superior de ratos (*Rattus norvegicus*) mantidos em diferentes sistemas de ventilação.**

**Autora: Carmem Elza Giordano Baialardi  
Dissertação apresentada como requisito 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**

**2003**

Carmem Elza Giordano Baialardi

“Avaliação de padrões morfológicos e funcionais do epitélio respiratório superior de ratos ( *Rattus norvegicus* ) mantidos em diferentes sistemas de ventilação.”

Aprovado em 31/03/2003

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. André Silva Carissimi  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. David Driemeier  
Membro da Comissão

---

Profa. Dra. Cristina Gevher Fernandes  
Membro da Comissão

---

Dra. Maria Araújo Teixeira  
Membro da Comissão

**AGRADECIMENTOS:**

A DEUS , que tornou isto possível, com a certeza de que estará ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

A meus pais e a minha irmã, pelo amor, pelo carinho, pela compreensão , pelo incentivo e apoio durante toda a minha caminhada.

Aos colegas e novos amigos, dos quais levarei a amizade e a lembrança dos dias passados juntos.

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

A todas as pessoas que, de alguma forma, anônimas ou não, contribuíram para que este trabalho se realizasse.

Ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que me proporcionou este aperfeiçoamento profissional.

Enfim, um especial agradecimento à aquela que nos acolhe nos momentos mais difíceis da caminhada, a mãe de todos nós, Nossa Senhora.

**"Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui.  
Sê tudo em cada coisa põe quanto és no mínimo que fazes.  
Assim, em cada lago a lua toda brilha porque alta vive."**

**Fernando Pessoa.**

## 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 necessário uma melhor avaliação desses sistemas, principalmente no que tange às respostas dos animais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a integridade do epitélio do trato respiratório superior (septo nasal e traquéia) de ratos mantidos em sistema VMA. Cem ratos, da linhagem Wistar-Hannover, heterogênicos, machos, de padrão sanitário convencional, foram mantidos durante 6 meses em dois distintos sistemas de ventilação: ventilação para conforto (grupo VGD, controle) e sistema VMA com intervalos de troca de cama variando de 3, 5, 7 e 9 dias (grupos IT3, IT5, IT7 e IT9, respectivamente). Após a eutanásia dos animais, fragmentos de septo nasal e traquéia foram coletados, processados com rotina de técnica histológica e corados com combinação de ácido periódico de Shiff e azul alciano (PAS-AB) e hematoxilina-eosina (HE). Os parâmetros morfométricos avaliados em septo nasal foram: 1) área de epitélio por unidade de superfície de membrana basal (EP/MB), 2) área de cílios por unidade de superfície de membrana basal (CI/MB), 3) número de núcleos por unidade de superfície de membrana basal (NN/MB), 4) área de muco ácido por unidade de superfície de membrana basal (MAc/MB), 5) área de muco ácido por área de epitélio (MAc/EP) e 6) número de núcleos por área de epitélio (NN/EP).

Para NN/MB, o grupo VGD apresentou diferença estatística com os grupos IT3, IT5 e IT9. Para NN/EP, o grupo VGD teve diferença estatística com os todos grupos mantidos em VMA (IT3, IT5, IT7 e IT9). Em AE/MB observou-se diferença significativa do grupo VGD com os grupos IT7 e IT9. Para CI/MB notou-se diferença significativa entre os grupos IT3 e IT7. Embora não foi demonstrada diferença

significativa entre os demais grupos, os dados sugerem que o grupo IT3 apresenta proporcionalmente maior área de cílios em relação aos demais grupos. Em MAc/MB e MAc/EP observou-se diferença significativa entre os grupos VGD e IT7.

Na avaliação qualitativa da traquéia por escores, predominou a lesão inflamatória crônica, com intenso infiltrado de mononucleares (predominando neutrófilos). A presença e intensidade dessas lesões variaram de acordo com o sistema de ventilação sendo que somente no grupo VGD é que foram encontradas lesões severas (grau III).

Com base nos resultados obtidos, os animais mantidos no sistema VMA, independente do intervalo de trocas de cama a que foram submetidos, apresentaram menor intensidade de lesões no septo nasal e na traquéia do que os animais mantidos em VGD. A maior integridade epitelial pode ser relacionado com a qualidade das condições ambientais fornecida aos animais alojados no sistema VMA, confirmando ser este o sistema mais adequado para a manutenção de ratos em experimentação.

## **ABSTRACT**

*During the last decade, the use of intracage ventilation systems (VMA) in animal facilities has improved the health status of animals by better environmental control supplied by these systems. Yet, there is little information upon use of VMA systems, mainly in that it refers to animals' responses. Thus, the purpose in this investigation was to evaluate epithelial integrity in upper airways (septum and trachea) of rats kept in VMA system. One hundred male Wistar-Hannover rats, conventional health status, were kept for 180 days under two different ventilation systems: general diluting ventilation system (VGD) with air conditioning for the control (VGD) group of 20 animals and VMA system with four groups of 20 animals each with bedding change frequency every three days (IT3 group), five (IT5 group), seven (IT7 group) and nine (IT9 group) days. At the conclusion of experiment, septum and trachea were collected and processed for histologic examination. Tissue sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) or periodic acid Schiff-Alcian Blue and then examined by light microscopy. Morphometric parameters evaluated in septum were: 1) epithelium area/length of basal membrane (EP/MB), 2) cilia area/ length of basal membrane (CI/MB), 3) nuclei/ length of basal membrane (NN/MB), 4) acid mucus area/ length of basal membrane (MAc/MB), 5) acid mucus area/epithelium area (MAc/EP) and 6) nuclei/epithelium area (NN/EP). NN/MB analysis revealed significant difference in VGD group compared to IT3, IT5, and IT9 groups. In NN/EP, VGD group showed statistic difference with all others groups. In AE/MB analysis, VGD presented lower area than IT7 and IT9 groups. CI/MB analysis revealed that IT3 group have higher area than IT7. MAc/MB and MAc/EP revealed difference between VGD and IT7 groups. Score evaluation of trachea showed several foci of inflammatory cells, predominantly mononuclear cells (neutrophils). Intensity of lesions varied according to the ventilation system in which animals were kept. Only VGD group presented severe lesions while all VMA groups revealed mild lesions. The results show that animals kept in VMA system, independent of bedding frequencies changes, have presented minor intensity of injuries in septum and trachea than animals kept in VGD group. The better epithelial integrity presented by group IT3 (for septum) and IT7 (for trachea) can be related with the high environmental quality supplied to the animals by VMA system, confirming to be this system more appropriate for maintenance of rats in animal facilities.*

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
<b>3 – MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>34</b>
3.1 – MATERIAL .....	34
3.1.1 – <i>Coleta do fragmento de traquéia</i> .....	34
3.1.2 – <i>Coleta do fragmento de septo nasal</i> .....	34
3.2 - SISTEMAS DE VENTILAÇÃO .....	35
3.2.1 – <i>Sistema de Ventilação para conforto (VGD)</i> .....	35
3.2.2 – <i>Sistema de Ventilação Microambiental (VMA)</i> .....	35
3.3 – SISTEMA DE CAPTURA DE IMAGEM .....	36
3.3.1 – <i>Hardware</i> .....	36
3.3.2 – <i>Softwares utilizados</i> .....	38
3.4 – PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	41
3.5 - AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE TRAQUÉIA .....	42
3.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
<b>4 – RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
4.1 – ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE SEPTO NASAL .....	44
4.1.1 – <i>Relação de número de núcleos por membrana basal</i> .....	45
4.1.2 – <i>Relação de número de núcleos por área de epitélio</i> .....	47
4.1.3 – <i>Relação da Área de epitélio por membrana basal (<math>\mu\text{m}</math>)</i> .....	49
4.1.4 – <i>Relação da Área de Cílios por unidade de membrana basal (<math>\mu\text{m}</math>)</i> .....	51
4.1.5 – <i>Relação de muco ácido por unidade de membrana basal (<math>\mu\text{m}</math>)</i> .....	53
4.1.6 – <i>Relação de muco ácido por área de epitélio (<math>\mu\text{m}^2</math>)</i> .....	55
4.2 – AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE TRAQUÉIA .....	60
<b>5 - DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>6- CONCLUSÕES:</b> .....	<b>69</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 - Representação esquemática do Sistema VGD.....	37
FIGURA 2 - Representação esquemática do Sistema VMA.....	37
FIGURA 3 – Foto parcial do sistema de captura de imagem. Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária – UFRGS.....	38
FIGURA 4 – Tela do programa PixelView Station v. 4.29TV em uso.....	39
FIGURA 5 – Tela ilustrativa do programa UTHSCA ImageTool em uso.....	41
FIGURA 6 – Relação de número de núcleos por membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Letras a,b indicam diferença significativa para teste de ANOVA $p < 0,05$ . PAS-AB, 360X.....	46
FIGURA 7 – Relação de número de núcleos por área de epitélio ( $\mu\text{m}^2$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Letras a,b indicam diferença significativa para teste de ANOVA $p < 0,05$ . PAS-AB, 360X.....	48
FIGURA 8 –Relação de área de epitélio ( $\mu\text{m}^2$ ) por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de troca de cama. PAS-AB, 360X.....	50
FIGURA 9 – Relação da área de cílios ( $\mu\text{m}^2$ ) por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Letras a,b indicam diferença significativa para teste de ANOVA $p < 0,05$ . PAS-AB, 360X.....	52
FIGURA 10 – Relação da área de muco ácido ( $\mu\text{m}^2$ ) por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. PAS-AB, 360X.....	54
FIGURA 11 – Relação de área de muco ácido pela área de epitélio em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Letras a,b indicam diferença significativa para teste de ANOVA $p < 0,05$ ... PAS-AB, 360X.....	56
FIGURA 12 – Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de septo nasal de ratos alojados no sistema	

	VGD. PAS-AB, 360X.....	57
FIGURA 13	– Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de septo nasal de ratos alojados no sistema VMA com intervalo de troca de cama de 3 dias. PAS-AB, 360X....	57
FIGURA 14	– Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de septo nasal de ratos alojados no sistema VMA com intervalo de troca de cama de 7 dias. Observar ausência de cílios.. PAS-AB, 360X.....	58
FIGURA 15	– Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de septo nasal de ratos alojados no sistema VMA com intervalo de troca de cama de 3 dias. Observar integridade do epitélio ciliado.. PAS-AB, 360X.....	58
FIGURA 16	– Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de septo nasal de ratos alojados no sistema VMA com intervalo de troca de cama de 3 dias. Notar ausência de muco.. PAS-AB, 360X.....	59
FIGURA 17	– Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de septo nasal de ratos alojados no sistema VMA com intervalo de troca de cama de 3 dias. Notar presença de muco ácido no epitélio. PAS-AB, 360X.....	59
FIGURA 18	– Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de traquéia de ratos alojados no sistema VGD. HE, 360X.....	61
FIGURA 19	– Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de traquéia de ratos alojados no sistema VMA com intervalo de troca de cama de 5 dias. HE, 360X.....	61

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 – Relação de número de núcleos por membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Porto Alegre, 2003.....	45
TABELA 2 – Relação de número de núcleos por área de epitélio ( $\mu\text{m}^2$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Porto Alegre, 2003.....	47
TABELA 3 – Relação da área de epitélio ( $\mu\text{m}^2$ ) por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Porto Alegre, 2003.....	49
TABELA 4 – Relação da área de cílios ( $\mu\text{m}^2$ ) por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Porto Alegre, 2003.....	51
TABELA 5 – Relação da área de muco ácido ( $\mu\text{m}^2$ ) por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Porto Alegre, 2003.....	53
TABELA 6 – Relação da área de muco ácido pela área de epitélio em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Porto Alegre, 2003.....	55
TABELA 7 – Avaliação histopatológica por escores de traquéia de ratos mantidos nos grupos controle e experimental. n=24 campos examinados por grupo. Porto Alegre, 2003.....	60

**LISTA DE QUADROS**

	Pág.
QUADRO 1 – Quantidade de animais e número de fragmentos de septo nasal analisados por grupo.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

VMA	Ventilação Microambiental.
VGD	Ventilação Geral Diluidora.
SPF	Animais Livres de Patógenos Específicos.
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono.
NH <sub>3</sub>	Amônia.
VLE	Ventilação para Processo.
MHV-Y	Vírus da Hepatite Viral Murina.
PIV	Positive Intracage Ventilation.
IT3	Grupo Experimental com intervalo de troca de cama a cada 3 dias.
IT5	Grupo Experimental com intervalo de troca de cama a cada 5 dias.
IT7	Grupo Experimental com intervalo de troca de cama a cada 7 dias.
IT9	Grupo Experimental com intervalo de troca de cama a cada 9 dias.
PVC	Polivinilcarbonato.
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
PAS	Ácido Periódico de Shiff.
AB	Azul Alciano.
HE	Hematoxilina-eosina.
EP/MB	Área de epitélio por unidade de superfície de membrana basal.
CI/MB	Área de cílios por unidade de superfície de membrana basal.
NN/MB	Número de núcleos por unidade de membrana basal.
MAc/MB	Área de muco ácido por unidade de superfície de membrana basal.
Mac/EP	Área de muco ácido por área de epitélio.
NN/EP	Número de núcleos por área de epitélio.
ACH	Trocas de ar por hora.

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1- INTRODUÇÃO

O controle ambiental em instalações destinadas a animais de laboratório é de fundamental importância em todos os tipos de pesquisa e particularmente em estudos crônicos. As respostas fisiológicas e comportamentais dos animais submetidos à experimentação devem ser constantes, previsíveis e não podem ser prejudicadas por doenças (C.C.A.C., 1984).

O alojamento e manejo adequados são essenciais para proporcionar o bem-estar animal, que é fundamental para a qualidade das pesquisas, ensino e testes nos quais estes animais são utilizados, além de ser importante para a saúde e segurança das pessoas envolvidas (pesquisadores e técnicos). Um programa adequado de manejo deve prover um ambiente e cuidados de modo a possibilitar aos animais o bom crescimento, desenvolvimento e reprodução adequados, boa saúde e bem-estar pelo controle das variáveis que podem afetar os resultados de pesquisas (I.L.A.R., 1996).

O conceito de reprodutibilidade experimental, ditado desde a década de 50, trouxe a conscientização da necessidade de padronização dos métodos empregados para criação e manutenção de animais para pesquisa, definindo-se primeiramente o padrão genético dos animais, aliado ao padrão sanitário.

Variações nas condições climáticas do macroambiente (sala de animais), relacionadas ao microambiente (caixa), podem causar alterações nas respostas dos animais quando em experimentação, o que pode ser prejudicial nas pesquisas em áreas como farmacologia e imunologia. Alguns estudos relacionados a animais de laboratório comprovam que o controle de temperatura, umidade e concentração de gases e particulados no microambiente contribuem para a sanidade e conforto animal (BESCH, 1992).

O microambiente para um animal de laboratório é o ambiente físico imediatamente ao seu redor, possuindo características peculiares de temperatura, umidade relativa e composição de gases do ar, quando comparadas com as do macroambiente. Os dados disponíveis na literatura indicam que a temperatura, umidade relativa, concentração de gases e matéria particulada são freqüentemente maiores no microambiente do animal, quando comparado ao macroambiente (I.L.A.R., 1996). Condições microambientais podem induzir mudanças nos processos metabólicos e fisiológicos ou mesmo causar alterações na susceptibilidade às doenças (BRODERSON et al., 1976).

Animais de laboratório mantidos no interior de salas geram uma série de poluentes, sendo o principal deles, o gás de amônia, tornando-se assim imprescindível a sua remoção. Da mesma forma, ar novo e limpo deve ser fornecido em quantidade e qualidade adequadas (OPAS, 1968, CCAC, 1980; SLAS 1989).

A amônia ( $\text{NH}_3$ ) é formada através da decomposição bacteriana da uréia presente na urina e fezes dos animais. Sua formação está diretamente relacionada com o número de animais alojados por caixa, número de caixas na sala, intervalo de trocas de cama, sistema de ventilação que é utilizado, temperatura e umidade relativa do ar (GAMBLE; CLOUGH, 1976).

O acúmulo de amônia no ambiente é inversamente proporcional à freqüência de trocas de cama, para uma taxa de ventilação constante (WHITE; MANS, 1984).

Concentrações inferiores a 10 ppm de amônia já são capazes de causar alterações nos movimentos ciliares da traquéia em ratos (SERRANO, 1971), bem como lesões no trato respiratório (GAMBLE; CLOUGH, 1976) e alterações no sistema imune (TARGOWSKI et al., 1984). Broderson et al. (1976), demonstraram haver uma relação direta entre níveis de amônia, freqüentemente encontrados nas

caixas de animais e a patogênese da micoplasmose respiratória. Lindsey e Conner (1978) demonstraram que maiores intervalos entre trocas de cama e limpeza das caixas facilitavam a progressão da micoplasmose respiratória em ratos inoculados com *Mycoplasma pulmonis*.

Com a finalidade de contornar os problemas, causados aos animais, pelo acúmulo de poluentes no microambiente (principalmente o gás de amônia), foi desenvolvido um equipamento capaz de efetuar ventilação no interior das caixas, com exaustão do ar para fora da sala, denominado de Ventilação Microambiental para biotérios (VMA), (MERUSSE, 1995; TEIXEIRA et al., 1999).

Experimentos realizados com camundongos (TEIXEIRA, 1995) e com ratos (CHAGURI, 1998), demonstraram melhor desempenho reprodutivo de animais mantidos em sistema de Ventilação Microambiental (VMA), quando comparado aos mantidos em salas de animais equipadas com o sistema tradicional, chamado de Ventilação Geral Diluidora (VGD), no qual a renovação de ar na gaiola seria feita de forma indireta, pela mistura de ar novo e limpo com o ar a ser removido da sala, removendo-se o produto dessa mistura. Estes mesmos autores observaram também, redução na incidência de lesões pulmonares dos animais mantidos em VMA atribuído, provavelmente, às baixas concentrações de amônia detectadas no interior das caixas.

A menor incidência de lesões no parênquima pulmonar pode ser decorrente da diminuição de poluentes no microambiente ocasionada pela exaustão do sistema microambiental. Porém, é necessário estudar outras regiões do trato respiratório, principalmente a região nasal que por meio de mecanismos como a filtração, aquecimento e umidificação do ar constitui-se da primeira linha de defesa não-imunológica do trato respiratório. A utilização de um fluxo de ar unidirecional no

interior da caixa sugere o aumento de particulados em suspensão no ar, podendo estes agredir mais intensamente a região nasal dos animais pela ação irritativa destes particulados, como o pó de ração e da maravalha. Desta forma, é importante avaliar a incidência de lesões na região nasal e traquéia em animais mantidos sob diferentes intervalos de troca de cama.

Desta forma, o presente estudo avaliou aspectos morfológicos e funcionais do epitélio na região nasal e traquéia de ratos mantidos em sistema microventilado (sistema VMA) com diferentes intervalos de troca de cama comparando com animais mantidos em sistema de ventilação convencional (sistema VGD). Assim, este trabalho tem por finalidade complementar as informações sobre a incidência de lesões nas vias aéreas contribuindo para a validação do uso de sistema VMA em biotérios.

## **2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os animais de laboratório podem ser considerados como uma importante ferramenta à disposição da ciência, sendo utilizados, direta ou indiretamente, como reagentes biológicos nos mais diversos protocolos experimentais. A medida que o pensamento científico evoluiu, a ciência de animais de laboratório também se desenvolveu para atender às necessidades emergentes da pesquisa científica. Este desenvolvimento consistiu da padronização das linhagens, dentro do princípio da reprodutibilidade experimental, ditado nos meados dos anos 50.

Desta maneira, as espécies animais foram padronizadas no aspecto genético e sanitário. A padronização genética possibilitou o desenvolvimento e manutenção de linhagens heterogênicas e isogênicas, mutante e mais recentemente animais knock-out e transgênicos. Sob ponto de vista sanitário, a obtenção de animais livres de patógenos específicos (SPF) e os gnotobióticos foram, sem dúvida, grandes conquistas. Devido a indissociabilidade do padrão sanitário com o ambiente físico, houve a obrigatoriedade de padronização do ambiente onde os animais são criados e mantidos, para a manutenção do padrão sanitário. Além disso, o controle ambiental também é importante para evitar que alterações nas variáveis ambientais influenciem negativamente as respostas dos animais em experimentação (CASSEL et al., 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, aplicaram-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 ( $\text{CO}_2$ ), partículas em suspensão e amônia ( $\text{NH}_3$ ) tendem a níveis mais elevados no microambiente. A remoção desses poluentes é necessária para a manutenção de condições favoráveis à criação dos animais. Além da remoção do ar poluído, é necessário o fornecimento de ar novo, limpo, em quantidade e qualidade adequadas (OPAS, 1968; CCAC, 1980; SLAS, 1989).

O processo de remoção ou fornecimento de ar, condicionado ou não, por meios naturais ou mecânicos, de/e/ou para um recinto fechado, com a finalidade de retirar poluentes ou manter condições de conforto é denominado de ventilação (MACINTYRE, 1990). A ventilação divide-se em dois grandes princípios: a ventilação para processo (VLE) e a ventilação para conforto (VGD). A VLE consiste, em geral, na remoção de poluentes industriais enquanto a VGD baseia-se no controle de temperatura e redução da tensão de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) em ambientes destinados à utilização humana (ASHRAE, 1997).

A aplicação da VGD em biotério iniciou-se em meados dos anos 40, com a utilização de um sistema no qual efetuava-se 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, Alshuler, com objetivo de superar as limitações da VGD ditadas por Munkelt (1938), 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. Essas recomendações possibilitaram que os biotérios

equipados com VGD possuísem ambientes de melhor qualidade. Contudo, o princípio da VGD foi se demonstrando de uso limitado para salas de animais pois não possibilita a renovação direta do ar no microambiente.

Deste modo, na década de 70, iniciaram-se estudos para desenvolver uma abordagem mais específica para biotérios. Lane-Peter (1970), propôs o que, talvez, viesse a ser o primeiro passo de uma nova tecnologia para a ventilação de biotérios. O autor descreveu uma estante constituída por uma câmara capaz de promover um fluxo de ar filtrado sobre as caixas, utilizando o ar proveniente da sala. Com equipamento semelhante, Vand Der Waaij e Andreas (1971) conseguiram prevenir a contaminação de animais gnotobióticos mantidos em caixas sem coberturas filtrantes. A primeira menção de um gabinete para animais, no qual foram acoplados equipamentos para controle térmico do ar, foi feita por Egan e Butler (1972) para o alojamento de frangos SPF.

McGarrity e Coriell (1973) verificaram a redução da contagem bacteriana no interior de um gabinete (com uma cortina vertical descendente de ar a 0,9 m/s) em relação à obtida na sala. As baixas contagens de colônias bacterianas foram também verificadas por Rylander e Hellström (1973) 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.

Allander e Abel (1973) descreveram um sistema no qual o ar era lançado na sala, pelo teto, e retirado desta por meio de aberturas na parede, atrás da estante, que coincidiam com o plano superior das caixas. Nesse sistema, o ar de exaustão era realmente retirado da sala após contato com as caixas, diminuindo a possibilidade de refluxo para a sala.

Gorton (1975) relata um sistema semelhante ao anterior, porém a massa de ar era lançada na sala, atravessava a estante pelo plano superior da caixa e era recolhida no que o autor denominou de "full-wall", uma câmara plena de pressão negativa cuja estrutura servia também para a separação das salas. McGarrity e Coriell (1976) utilizando uma câmara ventilada por fluxo vertical descendente de ar, demonstraram uma relação diretamente proporcional entre a velocidade do ar filtrado e a manutenção do estado sanitário de camundongos axênicos.

O emprego de coberturas filtrantes para controle de infecções no biotério agravou as diferenças entre macro e microambiente. Corning e Lipman (1991) estudaram o efeito de três diferentes tipos de filtros de tampas de caixas sobre o microambiente (temperatura, umidade relativa do ar, níveis de amônia e dióxido de carbono) em uma sala com ventilação convencional (VGD). As caixas com tampas com filtros à base de policarbonato apresentaram maiores concentrações de dióxido de carbono quando comparadas com filtros constituídos de poliéster. A umidade relativa do ar foi maior nas caixas providas com coberturas filtrantes, independentemente do tipo de filtro utilizado. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na temperatura e nos níveis de amônia, para os tipos de filtros utilizados, porém foram significativamente maiores daqueles observados no macroambiente.

Keller et al. (1983) adaptaram um sistema de ventilação individual para cada caixa provida 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 ( $\text{NH}_3$ ) entre 0 e 25 ppm, após 72 horas de alojamento dos animais (cinco camundongos adultos por caixa). Em um sistema semelhante, WU et al. (1985) mantendo camundongos durante 10 dias, registraram níveis internos de

NH<sub>3</sub> entre 0,1 e 0,5 ppm no interior das caixas ventiladas. Um outro sistema de ventilação consistia na insuflação de ar, a partir do teto para a sala, e colocação de um anteparo perfurado na porção anterior das estantes, que impedia o refluxo de ar. O ar era então recolhido por um duto de exaustão na porção posterior das caixas (YAMAUCHI et al., 1989).

Lipman et al. (1992) verificaram, como observado por Keller et al. (1983) e Wu et al. (1985), a redução nos níveis internos de amônia, CO<sub>2</sub> e umidade relativa do ar em caixas ventiladas. Posteriormente, Lipman et al. (1993) demonstraram a eficácia desse sistema na prevenção da disseminação do vírus da hepatite viral murina (MHV-Y) em camundongos. Huerkamp (1993), ao utilizar o sistema de ventilação anteriormente citado, conseguiu erradicar o parasita *Syphacia muris* de um lote de ratos, após tratamento com ivermectina. O mesmo tratamento não foi eficaz no lote controle, mantido em sala provida de VGD, com 14 trocas de ar por hora.

O uso de ventilação não reduz apenas a possibilidade de contaminação em biotérios como também permite certo grau de conforto térmico. Dentro de uma sala de biotério, a geração de calor é feita de forma contínua resultante do metabolismo dos animais. Os animais endotérmicos caracterizam-se por uma alta produção de calor metabólico (GORTON et al. 1976) e por possuírem mecanismos comportamentais e fisiológicos para regulação da geração ou perda de calor (GORDON, 1993). Assim, a manutenção da temperatura corporal depende de um equilíbrio entre a produção e perda de calor (HARDY, 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 o desempenho reprodutivo (YAMAUCHI et al., 1967; ZAKEM; ALLISTON, 1974).

A ventilação, além de proporcionar um certo grau de conforto térmico pela sensação de resfriamento (WEHIE, 1971), é capaz de remover amônia e outros poluentes de dentro do biotério. Besch (1985) cita que os níveis de  $\text{NH}_3$ , em salas de animais, com taxa de formação de 500 ppm/h, tendem a entrar em estabilidade à concentração de, aproximadamente, 30 ppm a uma taxa de ventilação equivalente a 20 trocas de ar/h. Taxas de ventilação com valor acima deste, em quase nada reduzem os níveis da amônia em equilíbrio. A  $\text{NH}_3$  é formada em decorrência da transformação da uréia, presente na urina e fezes dos animais, pela ação de bactérias urease positivas e está diretamente relacionada com o número de animais alojados, a temperatura e a umidade relativa do ar. Níveis de cerca de 200 ppm de  $\text{NH}_3$  são citados, após 10 dias de alojamento de camundongos (GAMBLE; CLOUGH, 1976; EVELEIGH, 1993). O acúmulo de amônia no ambiente é inversamente proporcional à frequência de trocas de cama, para uma taxa de ventilação constante (WHITE; MANS, 1984). Raramente, a amônia é encontrada em concentrações consideradas letais (acima de 3.000 ppm) nas salas de animais (De BOER et al., 1991). Para poluentes pouco tóxicos, altos níveis ambientais são aceitáveis, contudo, a amônia, em quantidades menores que 10 ppm já causa alteração nos movimentos ciliares da traquéia em ratos (SERRANO, 1971). Lesões no epitélio do trato respiratório ocasionadas pela amônia são freqüentemente 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 et al. 1981). Além dessas lesões inviabilizarem o animal para trabalhos experimentais, constituem-se em porta de entrada para muitos agentes infecciosos. Broderson et al. (1976) demonstraram haver uma relação direta entre os níveis de

NH<sub>3</sub>, freqüentemente encontrados nas caixas de ratos, e a patogênese da micoplasmose respiratória. Esta relação foi posteriormente confirmada por Lindsey e Conner (1978) quando demonstraram que maiores intervalos entre trocas de cama das caixas facilitavam a progressão da micoplasmose respiratória em ratos inoculados com *Mycoplasma pulmonis*. Em um outro trabalho, Schoeb et al. (1982) demonstraram que o aumento de unidades formadoras de colônias de *Mycoplasma pulmonis* na cavidade nasal, laringe, traquéia e pulmão de ratos estava diretamente relacionado com a concentração de amônia no ambiente em que os animais foram alojados.

Os poluentes presentes em salas de animais podem afetar também as pessoas que trabalham nas salas ou com animais, por estarem sujeitas ao desenvolvimento de processos alérgicos (FRANCIS, 1981). A alergia a animais de laboratório é uma doença considerada ocupacional que resulta em custos médicos, ausência ocasional ao trabalho ou, eventualmente, afastamento definitivo. (HUNSKAAR; FOSSE, 1990; LORUSSO et al., 1986; TURNER et al., 1992). O principal alérgeno foi identificado como sendo uma proteína secretada na urina de camundongos (denominada de Mus mI) e tem sua disseminação favorecida em ambientes com baixa umidade relativa do ar, o que torna indispensável em salas de animais, o controle deste fator ambiental (JONES et al., 1995).

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 (WU et al., 1985; KELLER et al., 1983; KUROSAWA et al., 1993; ).

Os sistemas de ventilação com pressão positiva (sistemas PIV – Positive Intracage Ventilation) até hoje descritos caracterizam-se pela insuflação de ar condicionado no interior das caixas com velocidades de ar variando de 0,09 m/s até 0,5 m/s (KUROSAWA et al., 1993; TU et al., 1997) e exaustão através de câmara plena de pressão negativa. Yoshida et al. (1995) observaram níveis de amônia de 20 ppm em caixas de ratos (biomassa de 500g/caixa) submetidas à uma velocidade de ar de 0,09 m/s (65 trocas de ar por hora) durante 13 dias sem troca de cama em um sistema PIV. Posteriormente, Hasegawa et al. (1997) relataram que essa mesma velocidade é suficiente para controlar as concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> no interior de caixas de ratos.

Baseando-se no mesmo princípio, Rossi et al. (1994) e Merusse et al. (1995) desenvolveram um equipamento capaz de efetuar apenas ventilação no interior das caixas dos animais, com exaustão do ar para fora da sala (sistema VMA). Tal sistema operava por meio de câmaras plenas de insuflação e de exaustão, não necessitando de dutos secundários de conexão entre as caixas e dutos principais, como nos sistemas anteriormente descritos.

Perkins e Lipman (1996) estudaram o microambiente em três sistemas comerciais microventilados (PIV) e compararam os níveis de contaminantes com aqueles encontrados em caixas convencionais. Eles não observaram diferenças significativas na temperatura e nos níveis de CO<sub>2</sub>, porém os níveis de amônia e a umidade relativa do ar foram maiores nas caixas convencionais em relação aos três tipos de caixas microventiladas. Quanto à intensidade e à frequência dos sons, observaram que os três sistemas microventilados produziam mais sons, até 250 Hz do que o macroambiente. Entretanto, esses sistemas geraram menos sons de alta frequência do que o macroambiente, que são os menos tolerados pelos animais.

Tais resultados indicam que os ruídos produzidos pelos sistemas PIV na faixa de frequência medida (31.5 Hz até 16 kHz), provavelmente exercem pouco efeito sobre os animais.

Clough et al. (1995) demonstraram que um sistema PIV comercial atende às exigências do *Home Office Code of Practice* da Inglaterra, sendo capaz de manter os animais livres de infecções e outros fatores estressantes, possibilitando um ambiente menos variável, e portanto, minimizando possíveis interferências nos experimentos, além de proteger o pesquisador.

Camundongos alojados em sistema VMA demonstraram uma performance reprodutiva sugestiva de aumento de produtividade em relação a camundongos mantidos em um sistema de VGD (TEIXEIRA, 1995). Estudos histopatológicos demonstraram a redução na incidência de lesões pulmonares nos filhotes nascidos no sistema (SINHORINI et al., 1994) atribuída, provavelmente, aos baixos níveis de amônia medidos no interior das caixas no sistema de ventilação microambiental (TEIXEIRA, 1995). Chaguri (1998) observou 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 de 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 velocidades 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 velocidades utilizadas, notadamente aquelas situadas entre 0,19 e 0,80 m/s.

Embora sabendo-se que taxas de renovação de ar do macroambiente em torno de 5 trocas de ar/hora já são suficientes para controlar níveis de amônia e CO<sub>2</sub>

no interior das caixas (REEB et al.,1997), os sistemas microambientais (PIV) atualmente comercializados, apresentam diferentes taxas de renovação de ar variando conforme o fabricante. Ainda é desconhecida qual é a melhor distribuição de ar no interior da caixa, a velocidade mais apropriada, tampouco qual a taxa de renovação de ar/hora mais adequada para propiciar um melhor alojamento aos animais (TU et al., 1997).

Sem dúvida, o uso de sistemas de ventilação que proporcionam renovação direta no interior das gaiolas são os que provem melhores condições ambientais no microambiente. Uma das conseqüências da utilização desse tipo de ventilação em biotério foi o redução da freqüência 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 CO<sub>2</sub> em função da freqüência de troca de cama do microambiente de caixas com camundongos em um sistema PIV. 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.

Os resultados obtidos até o momento com o sistema VMA questionam o uso de princípios de ventilação e condicionamento de ar para conforto humano em salas de animais, propondo um novo conceito de ventilação para biotérios de regiões tropicais, possibilitando melhorar a qualidade do ar, favorecendo a qualidade sanitária dos animais e a racionalização das práticas de manejo.

A formação de treze poluentes, incluindo amônia e CO<sub>2</sub>, em oito diferentes tipos de cama foram avaliados por Perkins e Lipman (1995) em caixas

microventiladas com velocidades em torno de 0,3 m/s. A cama oriunda do sabugo de milho ("corn cob") foi a que menos favoreceu a produção de amônia, possibilitando um aumento no intervalo de troca de cama e, diminuindo assim o estresse dos animais pelo manuseio das caixas.

Reeb-Whitaker et al. (2001) observaram que camundongos mantidos em um sistema PIV com intervalo de troca de cama de 14 dias não afetou 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 constitui-se na primeira linha de defesa não-imunológica, utilizando-se de mecanismos como a filtração, aquecimento e umidificação do ar. 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, transudato, proteínas e glicoproteínas sendo produzido por células especializadas nos brônquios e no epitélio das vias aéreas. Dessa maneira, a avaliação do muco e de suas propriedades reológicas possibilitam avaliar o meio ambiente nas salas de animais, pois o trato respiratório é um dos sistemas mais agredidos em condições ambientais desfavoráveis. Teixeira (2000) observou 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 passagens 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. 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 ratos, uma vez que, considerava impróprios os animais com doença respiratória para qualquer experimento a longo prazo, mesmo para pesquisas não respiratórias ou imunológicas.

Teixeira (2000) utilizou-se da análise histoquímica e morfométrica para avaliar as características morfológicas do epitélio nasal de ratos, em acasalamento no sistema VMA, para a determinação de concentração de mucina ácida e neutra, número de cílios e área de epitélio e de submucosa, não encontrando diferenças significativas quando comparados com animais mantidos em sistema VGD.

Desta forma, o presente trabalho avaliou aspectos morfométricos na região nasal e traquéia de ratos mantidos em sistemas microventilados e com diferentes intervalos de troca de cama, visando contribuir com maior número de informações para a validação do sistema VMA em biotérios.

## **3 – MATERIAL E MÉTODO**

### **3 – MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 – Material**

Foram utilizados fragmentos de septo nasal e traquéia provenientes de cem ratos, da linhagem Wistar-Hannover, heterogênicos, machos, de padrão sanitário convencional, mantidos em dois distintos sistemas de ventilação: ventilação para conforto (grupo VGD) e ventilação por processo (com intervalos de troca de cama variando de 3, 5, 7 e 9 dias denominados de grupos IT3, IT5, IT7 e IT9, respectivamente).

##### **3.1.1 – Coleta do fragmento de traquéia**

A eutanásia dos animais foi realizada pela administração de uma solução de pentobarbital sódico a 10% na dose de 100 miligramas por quilo (mg/kg), via intraperitoneal. A seguir, os animais eram colocados em decúbito dorsal e a pele da região cervical e respectiva serosa foram divulsionadas com auxílio de pinças e tesouras. Uma vez exposta a traquéia, um segmento longitudinal de aproximadamente 1 centímetro era extraído, armazenado e estocado em recipiente contendo aproximadamente 10 ml de solução de formol a 10% até o seu processamento no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

##### **3.1.2 – Coleta do fragmento de septo nasal**

Após a coleta do fragmento de traquéia, os animais eram colocados em decúbito ventral e com auxílio de um bisturi a pele da cabeça era dissecada.. Com auxílio de um costótomo, a articulação temporo-mandibular era desarticulada e a

cabeça era seccionada transversalmente no terço cranial com o mesmo instrumento. A seguir o septo nasal era dissecado com auxílio de pinças e tesouras rombas. Após extraído, o septo era armazenado e estocado em recipiente contendo aproximadamente 10 ml de solução de formol a 10% até o seu processamento no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **3.2 - Sistemas de Ventilação**

#### **3.2.1 – Sistema de Ventilação para conforto (VGD)**

As amostras de septo nasal e traquéia pertencentes ao grupo VGD foram obtidas de animais provenientes de biotério de padrão sanitário convencional com as seguintes condições ambientais: a sala possuía uma área de 8,4 m<sup>2</sup> e volume de 24,19 m<sup>3</sup> (3,0 x 2,80 x 2,88 metros), capacidade total de 73 caixas e lotação média de 150 animais, provida de sistema de VGD.

A ventilação pelo sistema VGD consiste de insuflação (entrada do ar) pelo teto através de uma rede de dutos ligadas a um conjunto motor/ventilador centrífugo com vazão e pressão adequados e com uma taxa de renovação de ar de 22 trocas de ar por hora. A exaustão (expurgo do ar) também era realizada através de um outro conjunto motor/ventilador centrífugo, por meio de dutos dispostos atrás das estantes, em três planos diferentes (superior, a 1,83 metros (m) do nível do piso; médio, a 1,07 m e inferior, a 0,3 m) (Figura 1).

#### **3.2.2 – Sistema de Ventilação Microambiental (VMA)**

O sistema de ventilação microambiental consiste de um equipamento produzido em forma de gabinete, com capacidade para 16 gaiolas, confeccionado

com materiais usuais para redes industriais de ventilação (chapa de aço galvanizado, estrutura de alumínio, conjunto motor/ventilador, flexíveis de alumínio ou dutos em Polivinilcarbonato (PVC), painéis de controle). Este tipo de sistema efetua a ventilação diretamente no interior das gaiolas (microambiente) diferentemente do tipo anterior (ventilação VGD) que promove a renovação do ar do ambiente (no caso, sala de animais) e, desta forma, a renovação do ar no interior das gaiolas é feita de forma indireta, em menor grau e com conseqüente maior acúmulo de poluentes quando comparado com o sistema microambiental. (Figura 2).

Assim, no sistema de ventilação microambiental, a insuflação de ar era realizada por meio de um conjunto motor/ventilador centrífugo com vazão ajustada em 890 metros cúbicos por hora ( $m^3/h$ ) que fazia a captura do ar diretamente da sala onde encontrava-se o gabinete. Após a captura, a massa de ar passava por um sistema de filtros conjugado ao motor/ventilador consistindo de pré-filtro “classe C” e filtro “classe B” (TROX<sup>®</sup> G3)(TORREIRA, 1991). A linha de insuflação ainda consistia de um sistema de aquecimento, regulado para entrar em funcionamento sempre que a temperatura ambiente no interior da linha de insuflação baixasse para menos de  $22 \pm 2^\circ C$ . A exaustão do ar também foi feita por um conjunto motor/ventilador centrífugo dimensionado para efetuar a descarga da massa de ar do gabinete para a atmosfera.

### **3.3 – Sistema de Captura de Imagem**

#### **3.3.1 – Hardware**

O sistema de captura de imagem foi montado no laboratório de micologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O sistema era composto por um microscópio trinocular da marca Nikon modelo Eclipse E400 no

qual foi conectado uma câmera CCD da marca Sony® modelo SSC-DC14 HyperHAD, com resolução de 470 linhas (Figura 3). A imagem capturada era transferida para um computador AMD 500 Mhz, com memória RAM de 512 Megabites equipado com placa de Rádio/TV/Captura, marca PixelView®, modelo PV-BT878P+ w/FM.

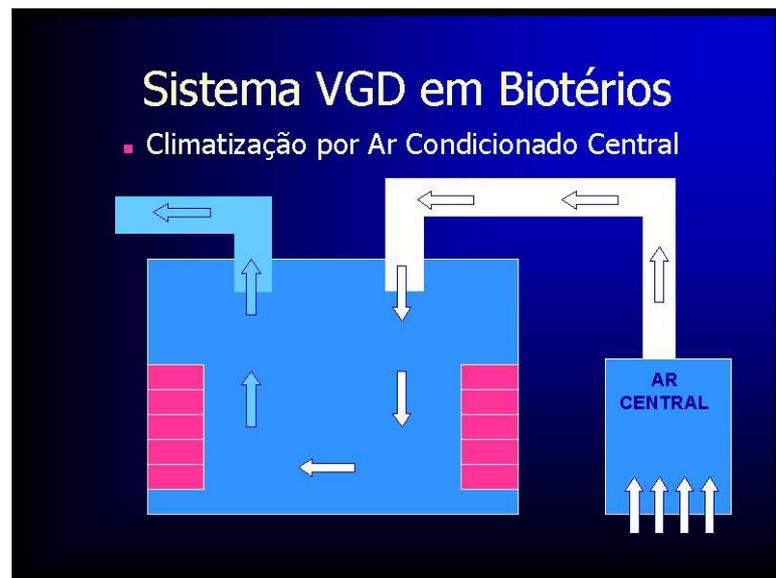


Figura 1 – Representação esquemática do Sistema VGD.

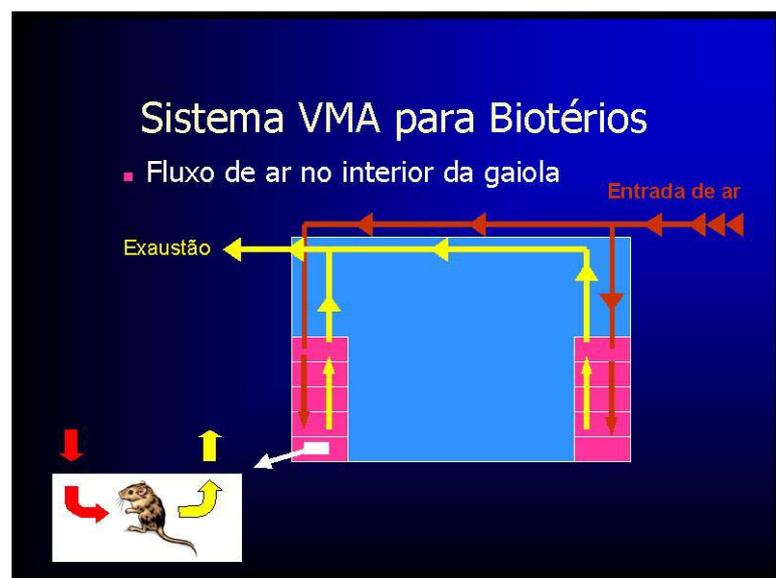


Figura 2 – Representação esquemática do Sistema VMA.

### 3.3.2 – Softwares utilizados

#### 3.3.2.1 – 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 4). A seguir, a imagem era armazenada em formato de intercâmbio de arquivos (formato JPEG) para posterior análise pelo software de análise de imagens.

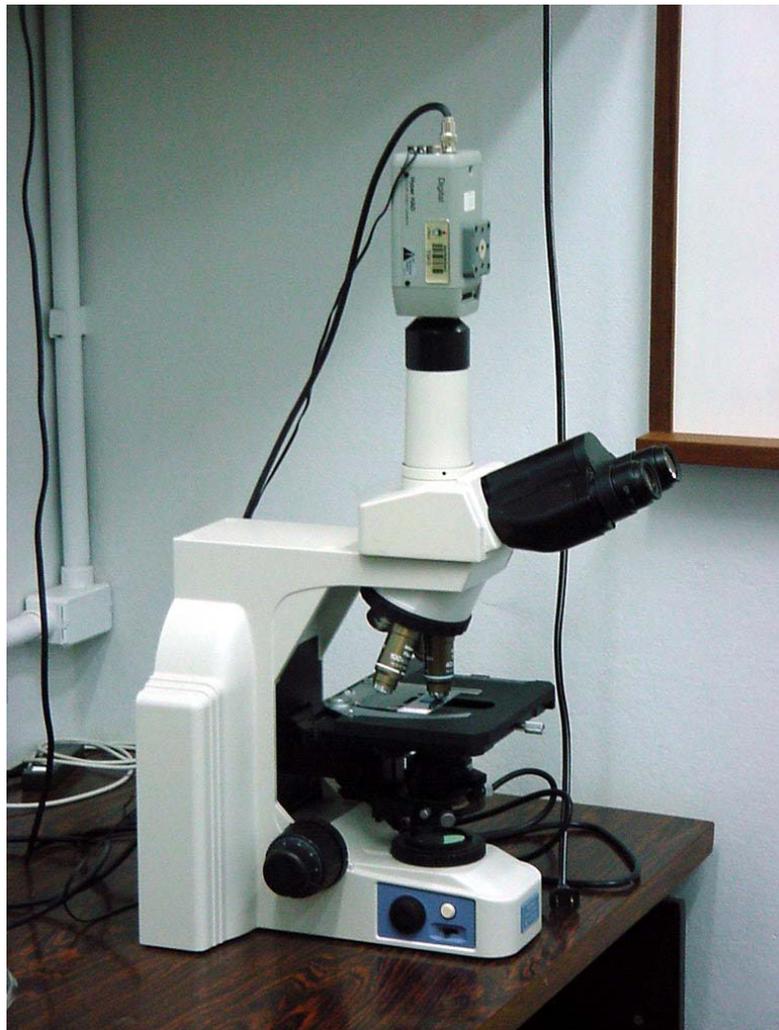


Figura 3 – Foto parcial do sistema de captura de imagem. Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária – UFRGS. 2002

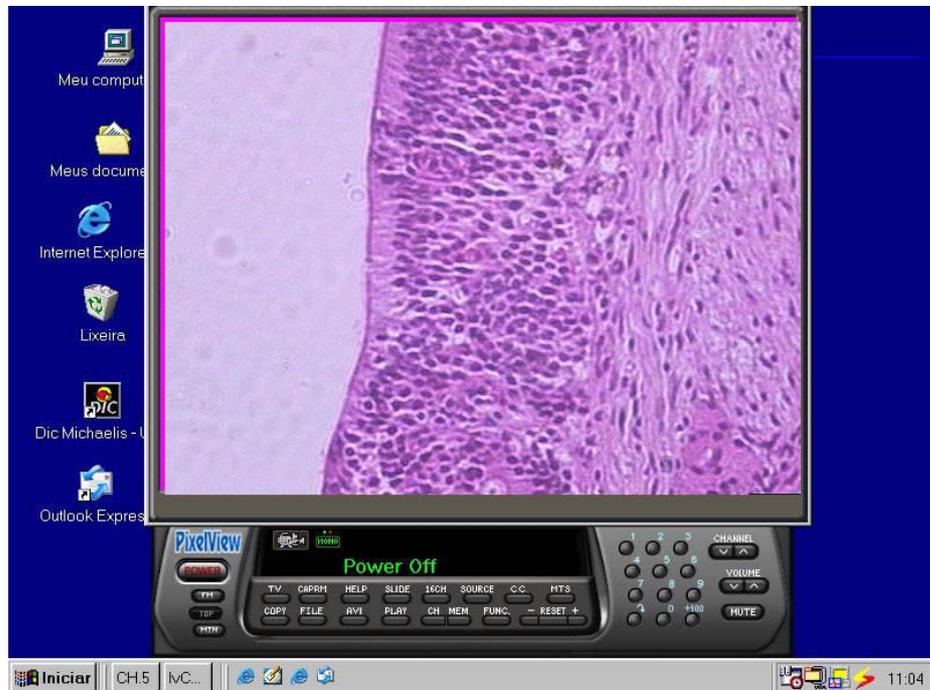


Figura 4 – Tela do programa PixelView Station v. 4.29TV em uso.

### 3.3.2.1 – Software de análise de imagens

Os arquivos contendo as imagens capturadas eram analisadas utilizando-se o programa ImageTool® for Windows, versão 3.00 (Figura 5) desenvolvido pela University of Texas Health Science Center in San Antonio (UTHSCA) e distribuído na versão freeware. O programa UTHSCSA ImageTool é um programa de análise e processamento de imagem para Windows® que permite o cálculo de alguns parâmetros em imagens digitalizadas. O software possibilita determinar variáveis como distância, ângulo, perímetro, área entre outras funções e exportar os resultados para outros programas.

### **3.3.2.1.1 – Calibração do software de análise de imagens**

Toda imagem digitalizada exibida no monitor do computador é uma representação de um objeto real (no presente caso, um fragmento de tecido) e que não apresenta as mesmas dimensões do objeto. O processo de calibração consiste na determinação das dimensões do pixel (pontos) em relação a cena real, uma vez que a imagem digitalizada é formada por números dispostos em matriz que reflete a intensidade de luz daquela região da imagem. Todo número da imagem (pixel) é representado por um ponto no dispositivo de saída (no caso, monitor do computador).

Assim, faz-se necessário a calibração a partir de um padrão com linhas horizontais e verticais conhecidas para que se possa realizar essa associação. No nosso caso, o padrão utilizado foi uma câmara Neubauer, que possui linhas horizontais e verticais de distância conhecida. Cada retículo é composto por 16 quadrados de 0,25 milímetros. Desta forma, a imagem digitalizada de um desses quadrados (0,25 mm) foi utilizada para determinar a dimensão do pixel e por uma regra de três obter o tamanho real do objeto.

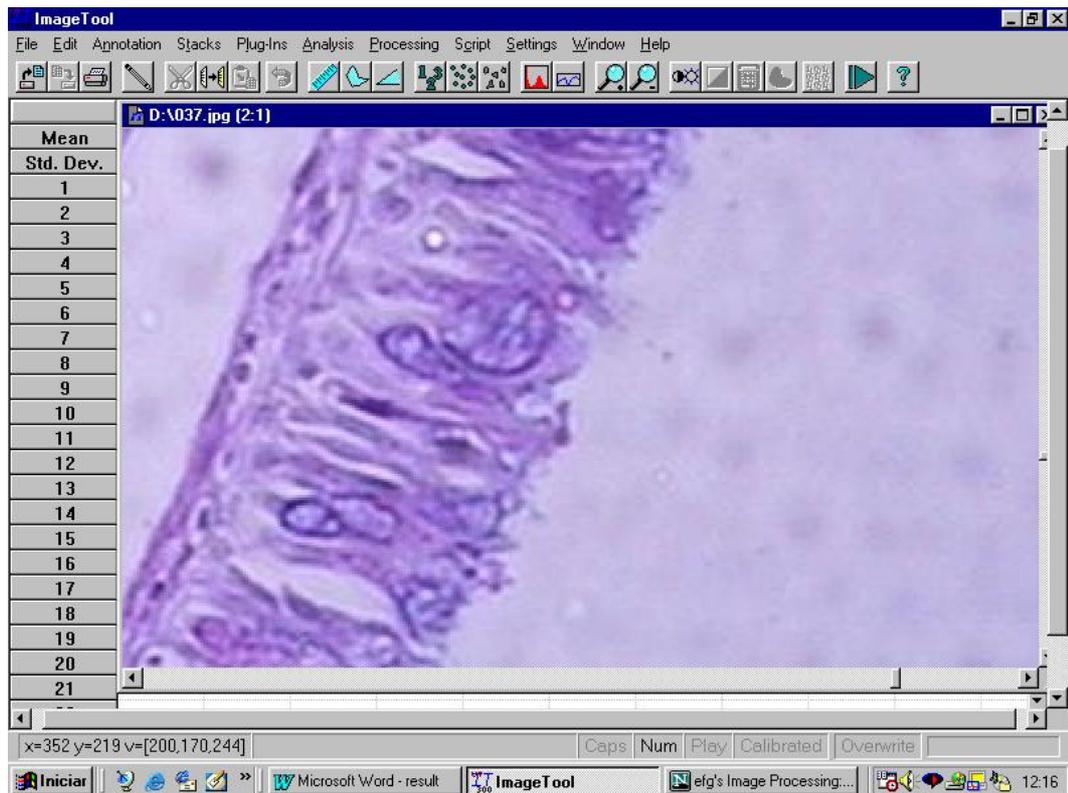


Figura 5 – Tela ilustrativa do programa UTHSCA ImageTool em uso

### 3.4 – Processamento histológico e Análise Morfométrica

O material coletado conforme descrito anteriormente (itens 3.1.1 e 3.1.2) foram processados com a rotina de técnica histológica no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS e corados de acordo com uma combinação de ácido periódico de Shiff (PAS) e azul alciano (AB) e hematoxilina-eosina (HE). A coloração especial utilizada possibilita a determinar a presença de mucinas neutras e ácidas, volume de cílios e área de epitélio. A coloração PAS-AB cora substâncias neutras do muco em tons de vermelho enquanto que as substâncias ácidas são visualizadas em coloração azulada (entre eles, pode-se destacar o ácido hialurônico, sialomucinas e mucinas sulfatadas).

Os parâmetros morfométricos avaliados foram: 1) área de epitélio por unidade de superfície de membrana basal (EP/MB), 2) área de cílios por unidade de superfície de membrana basal (CI/MB), 3) número de núcleos por unidade de superfície de membrana basal (NN/MB), 4) área de muco ácido por unidade de superfície de membrana basal (MAc/MB), 5) área de muco ácido por área de epitélio (MAc/EP) e 6) número de núcleos por área de epitélio (NN/EP) quantificados em 10 campos microscópicos e observados em 2 ou 3 cortes de tecido em aumento microscópio de 40 X.

### **3.5 - Avaliação qualitativa de traquéia**

Na avaliação qualitativa de traquéia foram atribuídos graus de acordo com a intensidade das lesões, que variou de intensidade entre os grupos, sendo o grau I atribuído quando existia até 25% do campo com lesões, o grau II quando a lesão atingia 75% do campo (considerado processo moderado) e grau III quando o processo era grave com destruição do parênquima celular e lesões em até 100% do campo analisado.

### **3.6 - Análise Estatística**

O teste não paramétrico de ANOVA Kruskal-Wallis foi empregado para analisar as possíveis diferenças entre as médias obtidas para os parâmetros morfométricos analisados no presente trabalho e para os escores atribuídos na avaliação qualitativa de traquéia. Estabeleceu-se o valor de 0,05 como nível de rejeição da hipótese de nulidade ( $p$ ).

## **4 – RESULTADOS**

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – Análise morfométrica de Septo nasal

Os septos nasais dos animais pertencentes aos grupos controle (VGD) e experimentais (IT3, IT5, IT7 e IT9) foram processados conforme metodologia descrita no item 3.4. Inicialmente cada grupo era composto por 20 amostras provenientes de cada animal do grupo, totalizando assim, 20 amostras por grupo. Entretanto, algumas preparações não puderam ser analisadas em função de problemas ocorridos durante o processamento. Desta forma, os grupos possuem número diferente de amostras analisadas. O Quadro 1 apresenta as quantidades de amostras analisadas por grupo.

Quadro 1 – Quantidade de animais e número de fragmentos de septo nasal analisados por grupo.

Grupo	Número de Animais	Amostras Analisadas
VGD	20	17
IT3	20	8
IT5	20	14
IT7	20	19
IT9	20	18

#### 4.1.1 – Relação de número de núcleos por membrana basal

A razão entre o número de núcleos por unidade de membrana basal estão demonstrados na Tabela 1 e ilustrados na Figura 6. Os resultados demonstram que o grupo controle (grupo VGD) apresentou diferença estatística significativa quando comparado com os grupos IT3, IT5 e IT9. Os dados obtidos indicam que os animais mantidos no grupo VGD apresentam maior celularidade do que os animais mantidos em sistema de ventilação microambiental.

Tabela 1 – Relação de número de núcleos por membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Porto Alegre, 2003.

Grupo	n	<u>Número de Núcleos</u> $\mu\text{m}$ Membrana Basal
VGD	17	0,17 $\pm$ 0,05 <b>a</b>
IT3	8	0,09 $\pm$ 0,05 <b>b</b>
IT5	14	0,12 $\pm$ 0,10 <b>b</b>
IT7	19	0,13 $\pm$ 0,07
IT9	18	0,10 $\pm$ 0,04 <b>b</b>

**a, b** na mesma coluna indica diferença significativa no teste de ANOVA  $p < 0,05$ .

VGD = grupo controle. Ventilação Geral Diluidora.

IT3, IT5, IT7, IT9- Grupos experimentais, com respectivos intervalos de troca de cama a cada 3,5,7,9 dias

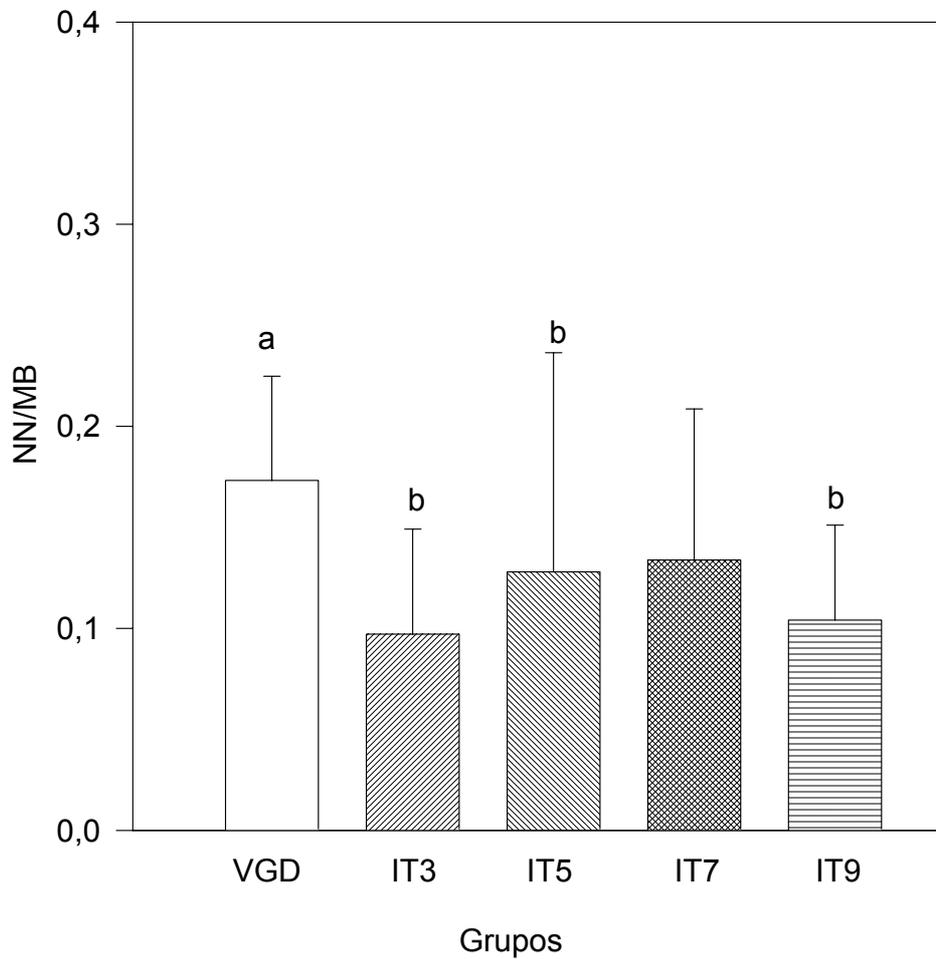


Figura 6 - Relação de número de núcleos por membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Letras **a,b** indicam diferença significativa para teste de ANOVA  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2 – Relação de número de núcleos por área de epitélio

A relação do número de núcleos pela área de epitélio está representada na Tabela 2 e ilustrados na Figura 7. Notou-se uma diferença significativa do grupo VGD com os todos grupos experimentais analisados (IT3, IT5, IT7 e IT9). Este resultado corrobora a maior densidade de núcleos no epitélio de septo nasal dos animais mantidos em ambiente com temperatura controlada (sistema VGD) do que animais mantidos apenas sob ventilação (sistema VMA).

Tabela 2 – Relação de número de núcleos por área de epitélio ( $\mu\text{m}^2$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Porto Alegre, 2003.

Grupo	n	<u>Número de Núcleos</u> $\mu\text{m}^2$
VGD	17	0,037 $\pm$ 0,001 <b>a</b>
IT3	8	0,018 $\pm$ 0,010 <b>b</b>
IT5	14	0,021 $\pm$ 0,008 <b>b</b>
IT7	19	0,017 $\pm$ 0,008 <b>b</b>
IT9	18	0,013 $\pm$ 0,007 <b>b</b>

**a, b** na mesma coluna indica diferença significativa no teste de ANOVA  $p < 0,05$ .

VGD = grupo controle. Ventilação Geral Diluidora.

IT3, IT5, IT7, IT9- Grupos experimentais, com respectivos intervalos de troca de cama a cada 3,5,7,9 dias

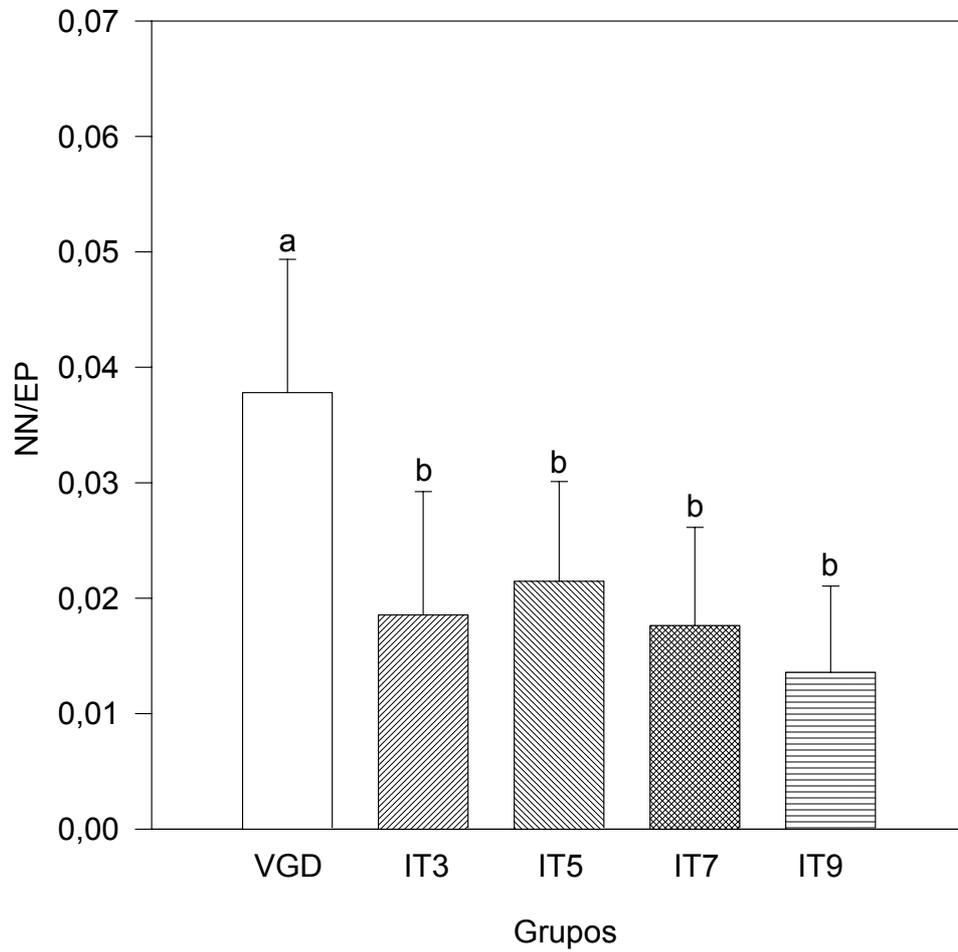


Figura 7 - Relação de número de núcleos por área de epitélio ( $\mu\text{m}^2$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Letras **a,b** indicam diferença significativa para teste de ANOVA  $p < 0,05$ .

#### 4.1.3 – Relação da Área de epitélio por membrana basal ( $\mu\text{m}$ )

A relação entre a área de epitélio por unidade de membrana basal encontra-se na Tabela 3 e ilustrada na Figura 8. Observou-se diferença significativa do grupo VGD com os animais mantidos em sistema microambiental com intervalos de troca de cama de 7 e 9 dias (grupos IT7 e IT9, respectivamente). Este parâmetro reflete a proporção entre volume de células (principalmente citoplasma) e indica que os animais dos grupos IT7 e IT9 apresentam proporcionalmente maior citoplasma do que os animais mantidos no grupo VGD.

Tabela 3 – Relação da área de epitélio ( $\mu\text{m}^2$ ) por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Porto Alegre, 2003.

Grupo	n	<u>Área de Epitélio (<math>\mu\text{m}^2</math>)</u> Membrana basal ( $\mu\text{m}$ )
VGD	17	5716,80 $\pm$ 1657,80 <b>a</b>
IT3	8	6813,60 $\pm$ 1515,00
IT5	14	5739,00 $\pm$ 3130,80
IT7	19	10057,20 $\pm$ 3931,20 <b>b</b>
IT9	18	10737,60 $\pm$ 4822,20 <b>b</b>

**a, b** na mesma coluna indica diferença significativa no teste de ANOVA  $p < 0,05$ .

VGD = grupo controle. Ventilação Geral Diluidora.

IT3, IT5, IT7, IT9- Grupos experimentais, com respectivos intervalos de troca de cama a cada 3,5,7,9 dias

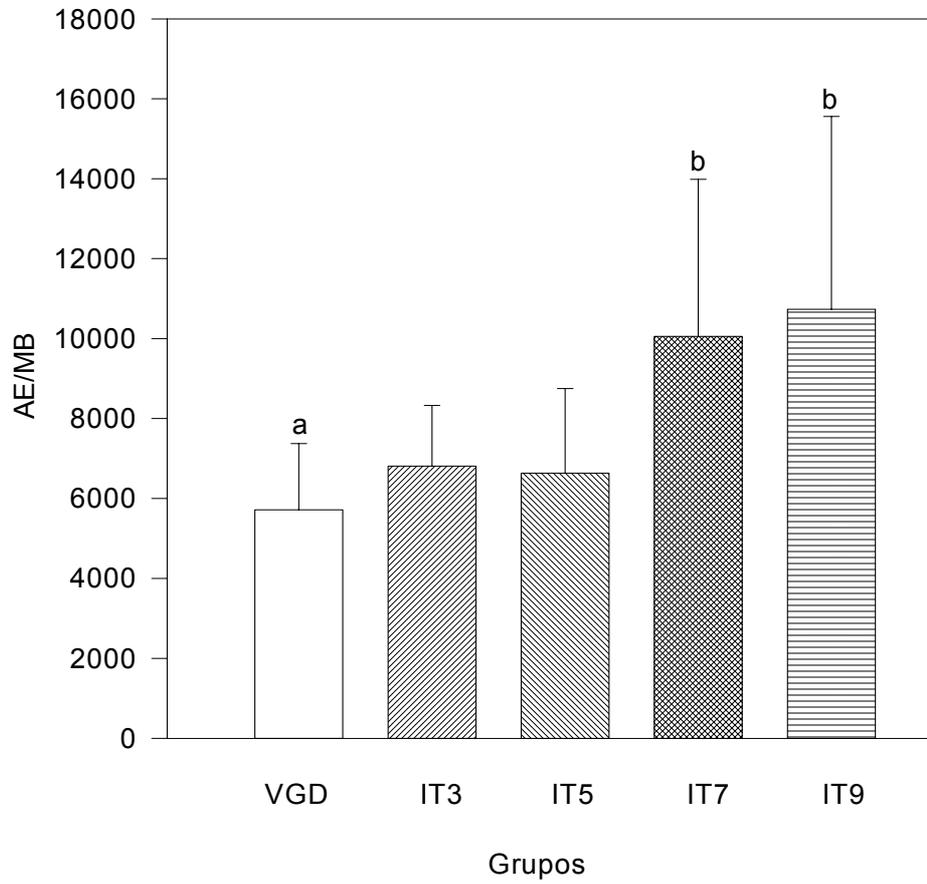


Figura 8- Relação de área de epitélio ( $\mu\text{m}^2$ ) por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Letras **a,b** indicam diferença significativa para teste de ANOVA  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4 – Relação da Área de Cílios por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ )

A relação entre a área de cílios por unidade de membrana basal está apresentada na Tabela 4 e representada na Figura 9. Notou-se que houve diferença significativa entre os grupos IT3 e IT7. Embora não foi demonstrada diferença significativa entre os demais grupos, os dados sugerem que o grupo IT3 apresenta proporcionalmente maior área de cílios, ou seja, possui uma maior integridade do epitélio ciliado em relação aos demais grupos.

Tabela 4 – Relação da área de cílios ( $\mu\text{m}^2$ ) por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Porto Alegre, 2003.

Grupo	n	<u>Área de cílios (<math>\mu\text{m}^2</math>)</u> Membrana basal ( $\mu\text{m}$ )
VGD	17	17,40 $\pm$ 18,60
IT3	8	34,20 $\pm$ 28,80 <b>a</b>
IT5	14	11,40 $\pm$ 20,40
IT7	19	6,6 $\pm$ 16,80 <b>b</b>
IT9	18	9,6 $\pm$ 17,4

**a, b** na mesma coluna indica diferença significativa no teste de ANOVA  $p < 0,05$ .

VGD = grupo controle. Ventilação Geral Diluidora.

IT3, IT5, IT7, IT9- Grupos experimentais, com respectivos intervalos de troca de cama a cada 3,5,7,9 dias

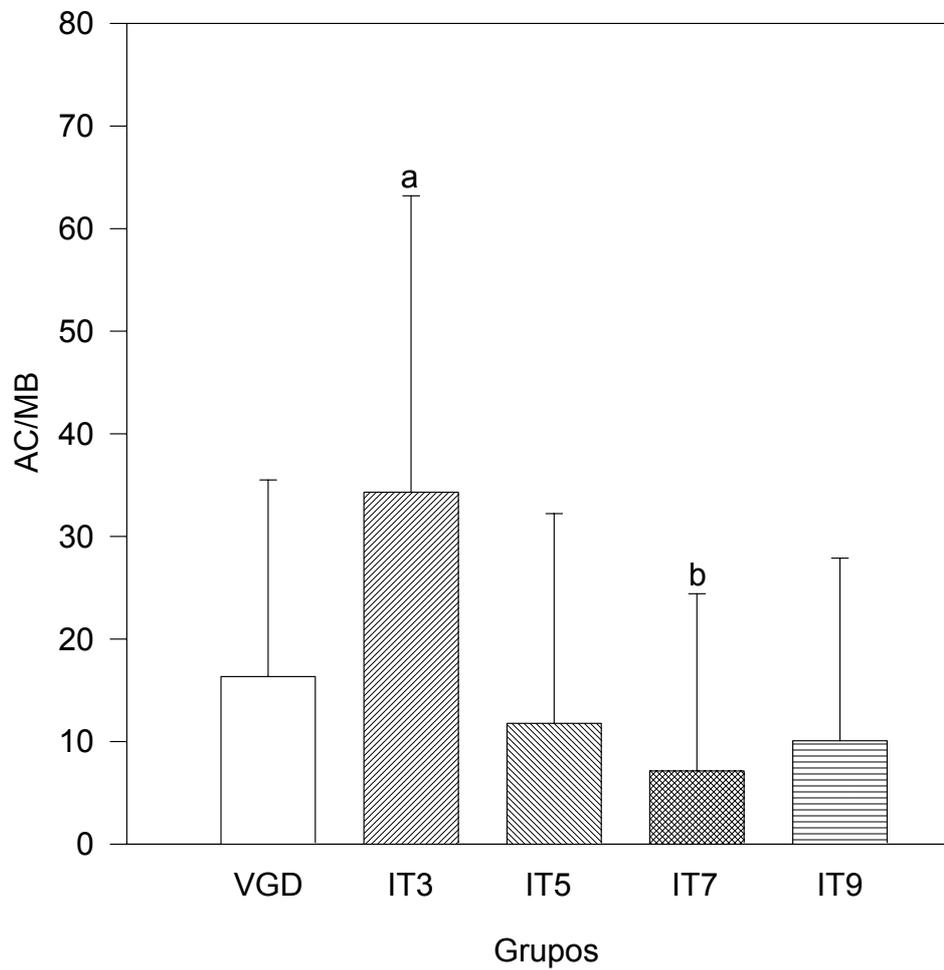


Figura 9- Relação da área de cílios ( $\mu\text{m}^2$ ) por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Letras **a,b** indicam diferença significativa para teste de ANOVA  $p < 0,05$ .

#### 4.1.5 – Relação de muco ácido por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ )

O volume de muco ácido presente nas amostras de septo nasal foi relacionado com unidade de membrana basal. Os resultados estão apresentados na Tabela 5 e representada na Figura 10. Observou-se diferença significativa entre os grupos VGD e IT7. Pela análise dos resultados, o grupo IT7 apresenta, em valores absolutos, animais com maior quantidade de muco ácido do que animais dos demais grupos.

Tabela 5 – Relação da área de muco ácido ( $\mu\text{m}^2$ ) por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Porto Alegre, 2003.

Grupo	n	<u>Área de muco ácido (<math>\mu\text{m}^2</math>)</u> Membrana basal ( $\mu\text{m}$ )
VGD	17	1273,20 $\pm$ 1121,40 <b>a</b>
IT3	8	2365,20 $\pm$ 2335,80
IT5	14	3149,40 $\pm$ 2514
IT7	19	4747,80 $\pm$ 3175,20 <b>b</b>
IT9	18	2488,80 $\pm$ 1386,60

**a, b** na mesma coluna indica diferença significativa no teste de ANOVA  $p < 0,05$ .

VGD = grupo controle. Ventilação Geral Diluidora.

IT3, IT5, IT7, IT9- Grupos experimentais, com respectivos intervalos de troca de cama a cada 3, 5, 7, 9 dias

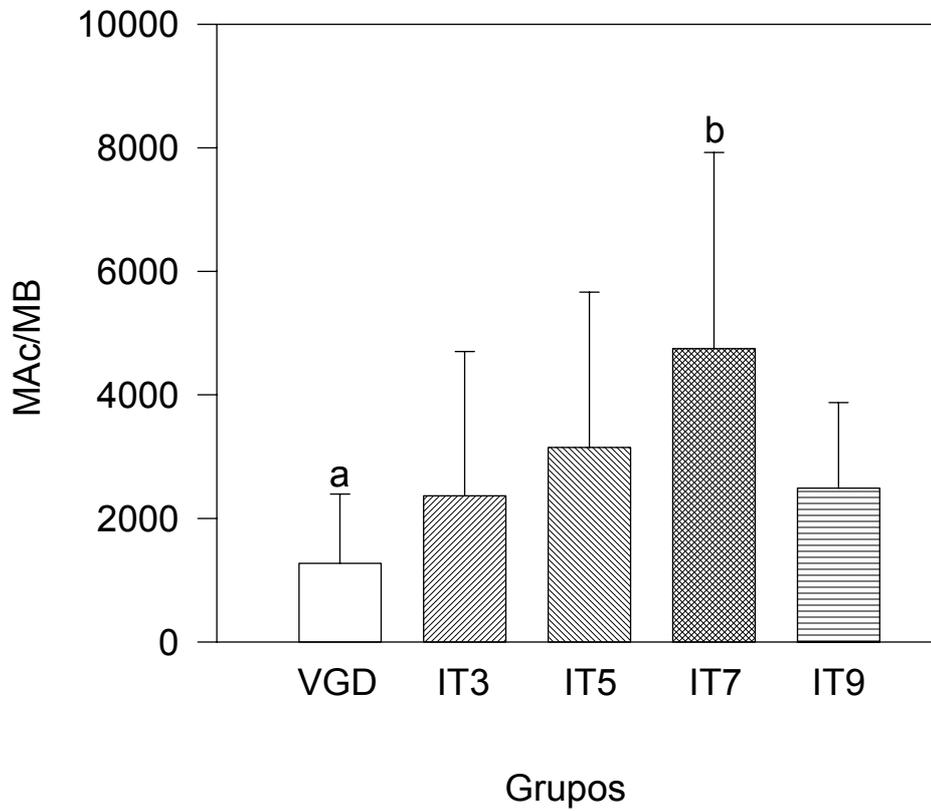


Figura 10 - Relação da área de muco ácido ( $\mu\text{m}^2$ ) por unidade de membrana basal ( $\mu\text{m}$ ) em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Letras **a,b** indicam diferença significativa para teste de ANOVA  $p < 0,05$ .

#### 4.1.6 – Relação de muco ácido por área de epitélio ( $\mu\text{m}^2$ )

O volume de muco ácido presente nas amostras de septo nasal foi também relacionado com a área de epitélio. Os resultados estão expressos na Tabela 6 e representada na Figura 11. Notou-se que houve diferença significativa entre os grupos VGD e IT7. Este resultado é similar ao encontrado quando relacionou-se o volume de muco ácido por unidade de membrana basal ( ítem 4.1.5).

Tabela 6 – Relação da área de muco ácido pela área de epitélio em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Porto Alegre, 2003.

Grupo	n	$\frac{\text{Área de muco ácido}}{\text{Área de epitélio}}$
VGD	17	0,22 ± 0,21 <b>a</b>
IT3	8	0,32 ± 0,29
IT5	14	0,54 ± 0,47
IT7	19	0,49 ± 0,32 <b>b</b>
IT9	18	0,28 ± 0,19

**a, b** na mesma coluna indica diferença significativa no teste de ANOVA  $p < 0,05$ .

VGD = grupo controle. Ventilação Geral Diluidora.

IT3,IT5,IT7,IT9- Grupos experimentais, com respectivos intervalos de troca de cama a cada 3,5,7,9 dias

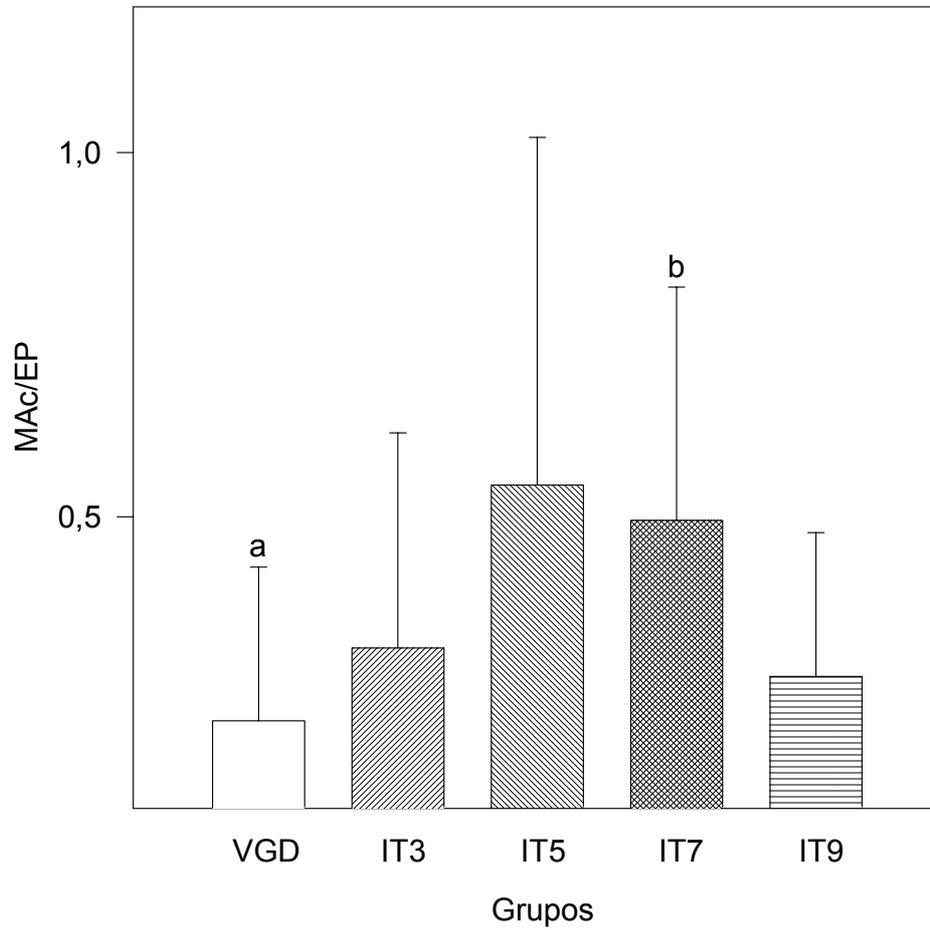


Figura 11 - Relação de área de muco ácido pela área de epitélio em septo nasal de animais mantidos em sistemas VGD e VMA com diferentes intervalos de trocas de cama. Letras **a,b** indicam diferença significativa para teste de ANOVA  $p < 0,05$ .

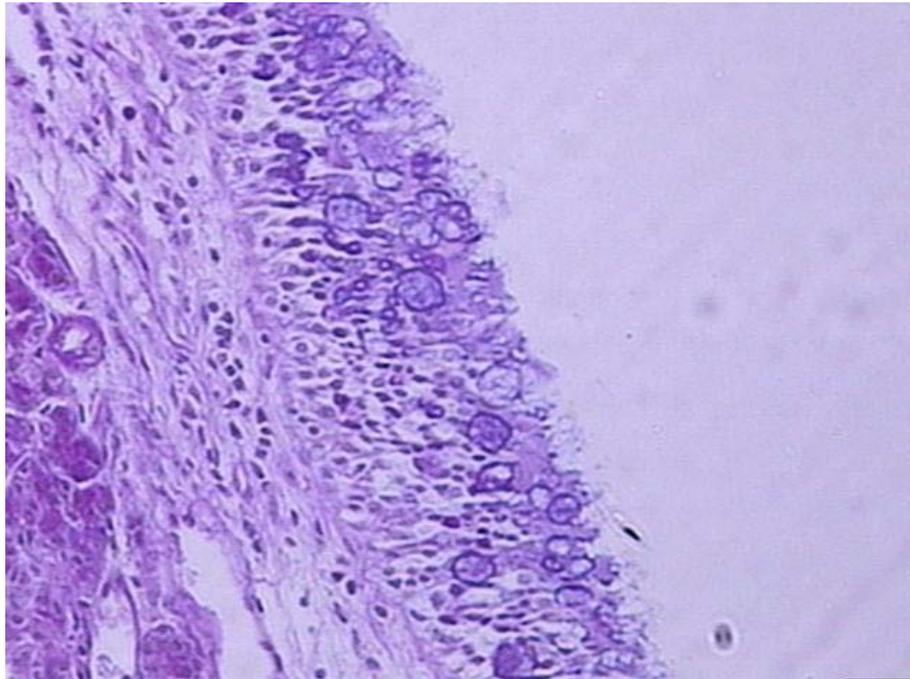


FIGURA 12 – Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de septo nasal de ratos alojados no sistema VGD. Notar a alta densidade de núcleos no epitélio e presença de muco abundante. PAS-AB, 360X.

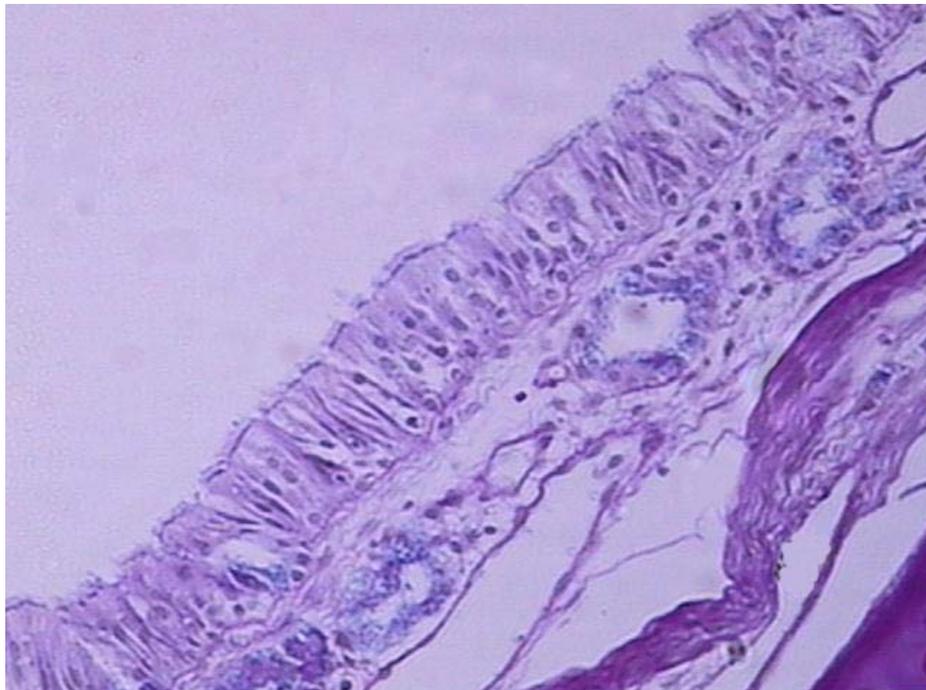


FIGURA 13 – Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de septo nasal de ratos alojados no sistema VMA com intervalo de troca de cama de 3 dias. Notar a menor celularidade no epitélio. PAS-AB, 360X.

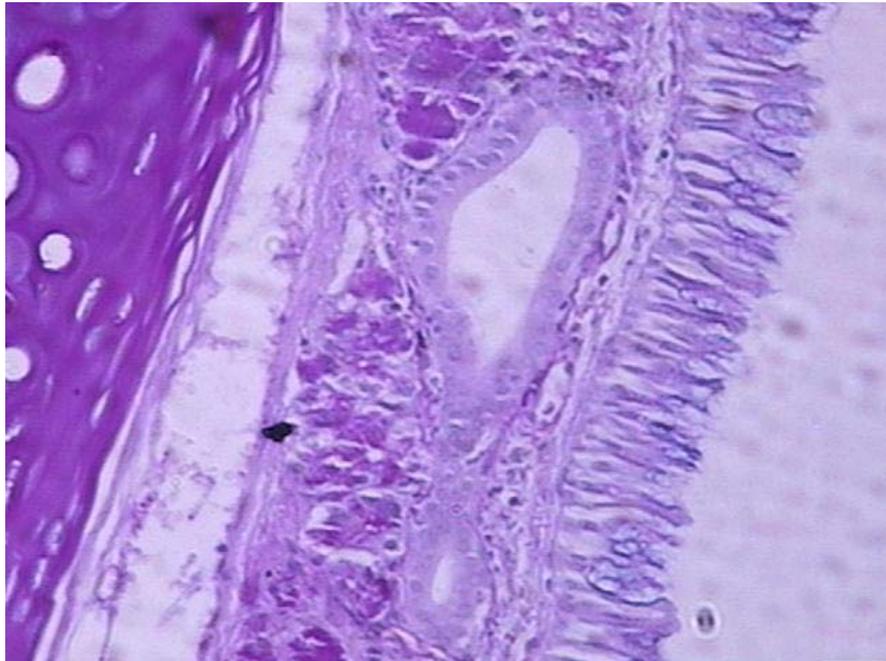


FIGURA 14 – Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de septo nasal de ratos alojados no sistema VMA com intervalo de troca de cama de 7 dias. Observar ausência de cílios na área representada. PAS-AB, 360X.

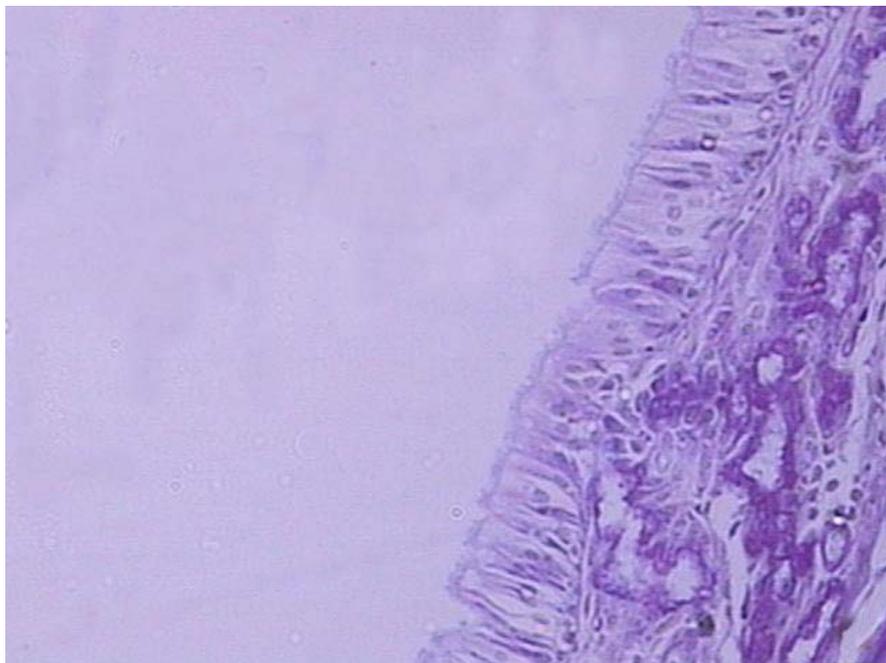


FIGURA 15 - Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de septo nasal de ratos alojados no sistema VMA com intervalo de troca de cama de 3 dias. Observar integridade do epitélio ciliado. PAS-AB,360X

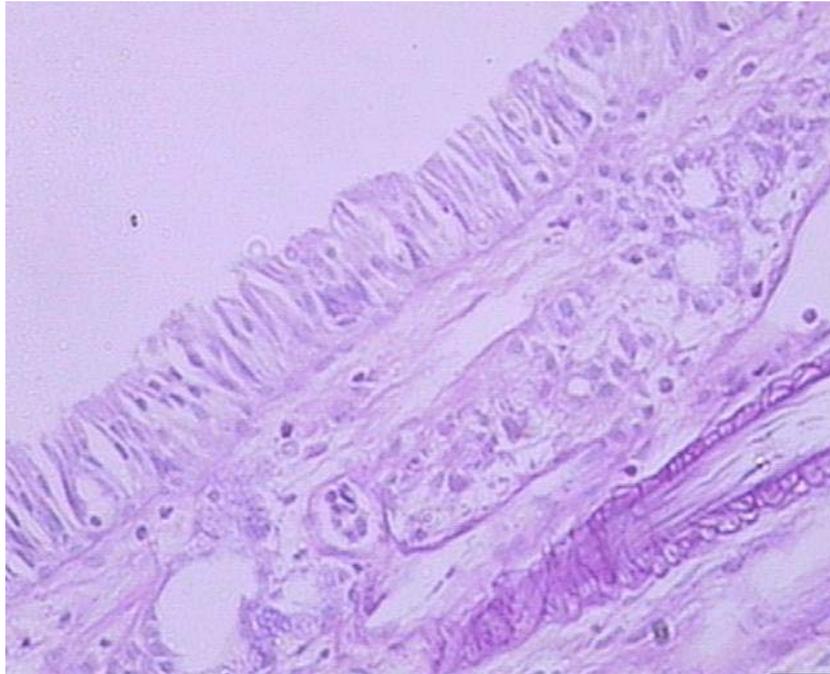


FIGURA 16 – Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de septo nasal de ratos alojados no sistema VMA com intervalo de troca de cama de 3 dias. Notar ausência de muco. PAS-AB, 360X.

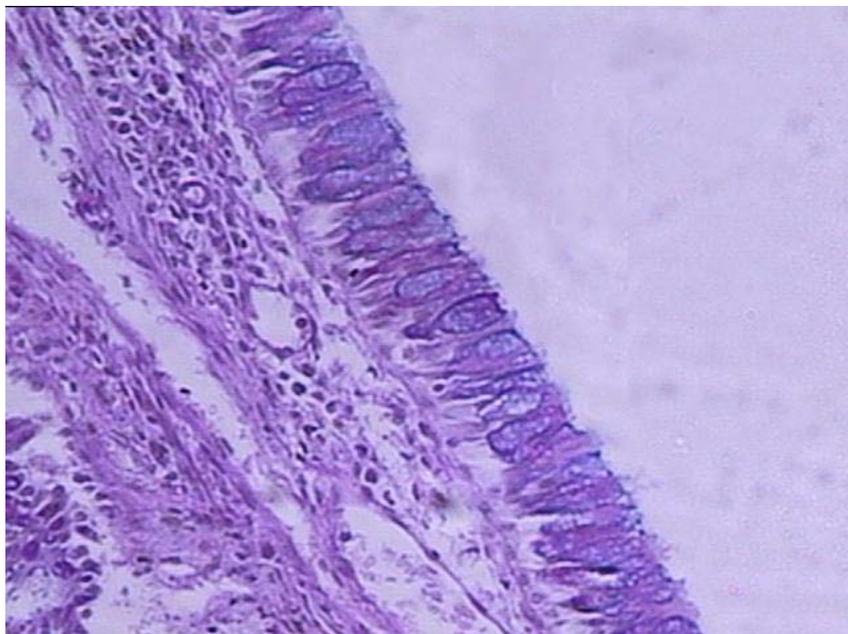


FIGURA 17 – Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de septo nasal de ratos alojados no sistema VMA com intervalo de troca de cama de 3 dias. Notar presença de muco ácido no epitélio. PAS-AB, 360X.

#### 4.2 – Avaliação qualitativa de Traquéia

A lesão predominante, encontrada nos fragmentos de traquéia analisados, foi a inflamação crônica, com intenso infiltrado de mononucleares, predominando neutrófilos. Na avaliação por escores foram atribuídos graus de acordo com a intensidade das lesões, que variou de intensidade entre os grupos, sendo o grau I atribuído na ausência de lesões, o grau II quando o processo era moderado e grau III quando o processo era grave com destruição do parênquima celular. A presença e intensidade dessas lesões variaram de acordo com o sistema de ventilação (Tabela 7). O grupo experimental apresentou significativamente menos lesões de Grau I do que o grupo VGD. Somente no grupo controle é que foram encontradas lesões consideradas Grau III. As FIGURAS 18 a 19 correspondem a imagens digitalizadas das lesões de traquéia encontradas nos animais em cada grupo.

Tabela 7 – Avaliação histopatológica por escores de traquéia de ratos mantidos nos grupos controle e experimental. Hematoxilina- eosina, 360X. n=24 campos examinados por grupo. Porto Alegre, 2003.

GRUPOS	LESÕES					
	Grau I		Grau II		Grau III	
	mediana	percentil	Mediana	percentil	mediana	percentil
VGD	0,00 <sup>a</sup>	0,00-1,00	0,25	0,00-0,50	0,00 <sup>c</sup>	0,00-1,00
IT3	0,00	0,00-0,50	0,25	0,00-0,50	0,00 <sup>d</sup>	0,00-0,00
IT5	0,00	0,00-0,50	0,375 <sup>a</sup>	0,25-0,75	0,00 <sup>d</sup>	0,00-0,25
IT7	0,00	0,00-0,25	0,00 <sup>b</sup>	0,00-0,50	0,00 <sup>d</sup>	0,00-0,00
IT9	0,00 <sup>b</sup>	0,00-0,25	0,25	0,00-0,50	0,00 <sup>d</sup>	0,00-0,00

Grau I- ausência de lesões Grau II – Traqueíte moderada Grau III- Traqueíte grave

\* Os dados estão expressos em mediana dos escores atribuídos as lesões encontradas nos campos microscópicos observados em cada grupo (n=24)

*a, b e c, d* diferença significativa para teste de ANOVA Kruskal-Wallis.  $p < 0,05$ .

VGD = grupo controle. Ventilação Geral Diluidora.

IT3, IT5, IT7, IT9- Grupos experimentais, com respectivos intervalos de troca de cama a cada 3,5,7,9 dias

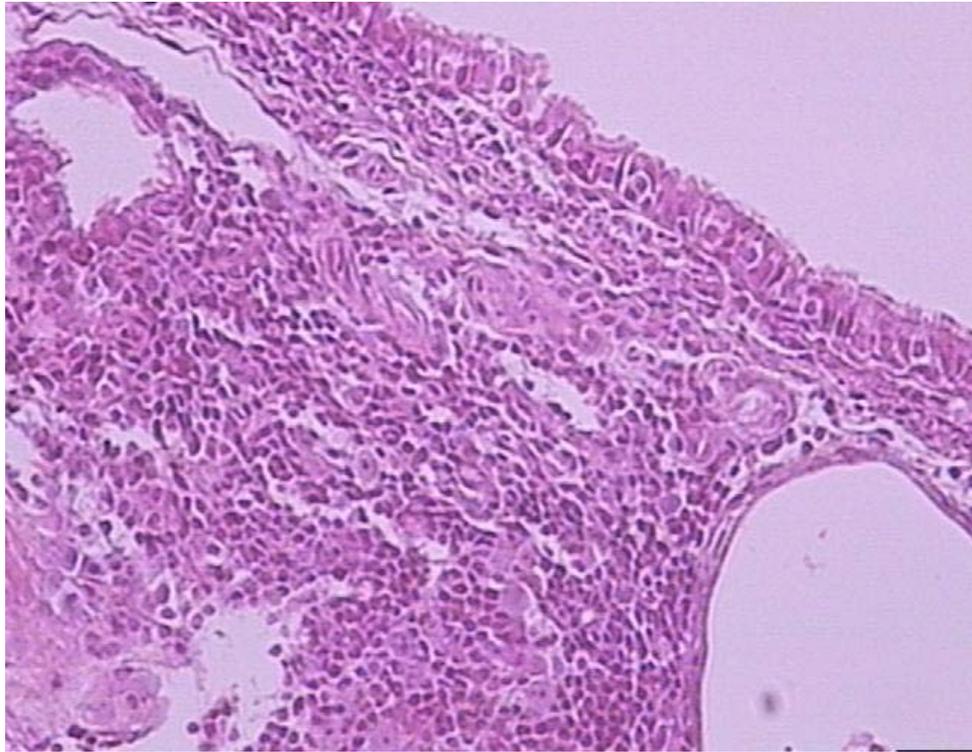


FIGURA 18 – Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de traquéia de ratos alojados no sistema VGD. Notar intenso infiltrado de células inflamatórias mononucleares. Traqueíte grave. Lesão de grau III. HE, 360X.

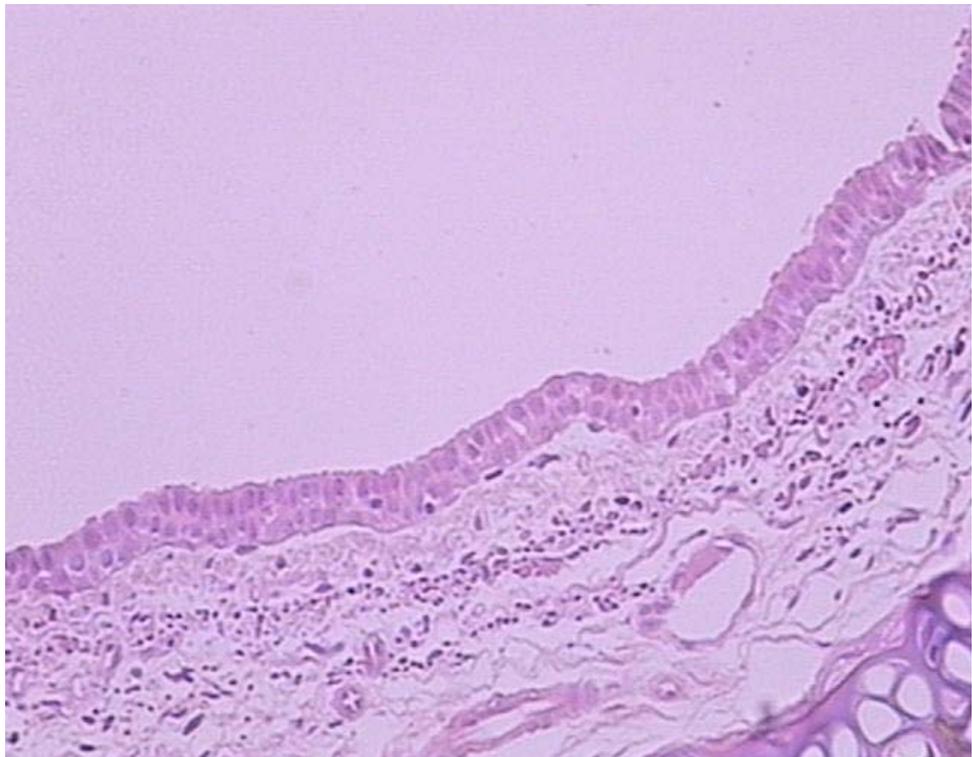


FIGURA 19 – Avaliação histológica por digitalização de imagem de corte histológico obtido de traquéia de ratos alojados no sistema VMA com intervalo de troca de cama de 5 dias. Notar a discreta ou quase inexistente lesão inflamatória na traquéia. HE, 360X.

## **5 - DISCUSSÃO**

## 5 - 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 neste 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 no sistema VMA e animais mantidos em um 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 em avaliar parâmetros que pudessem corroborar 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 em sistema VGD, não possuem qualquer indicativo de alteração comportamental e em certas condições possuem desempenho reprodutivo superior

aos animais alojados em sistema VGD (TEIXEIRA et al., 1999, TEIXEIRA et al., 2001; CARISSIMI et al., 2000; CHAGURI et al., 2001).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi agregar novos dados às informações hoje disponíveis sobre o sistema VMA, respondendo questões específicas no que diz respeito a morfometria de septo nasal e traquéia em ratos.

Em nosso estudo, encontramos diferenças significantes na avaliação morfométrica das preparações histológicas entre os grupos analisados, nos parâmetros analisados: área de epitélio, cílios, muco ácido, número de núcleos. A escolha destes parâmetros foi fundamentada na sua facilidade de obtenção e na indicação de possíveis alterações nas características dos epitélios avaliados.

De uma maneira geral, os resultados diferem das observações relatadas por Teixeira (2000) que não encontrou diferença significativa entre ratos adultos, utilizados como reprodutores, mantidos em sistemas VGD e VMA, para índices morfométricos como volume de muco ácido, muco neutro, epitélio, submucosa e cílios. A divergência de resultados pode estar associada a condição de alojamento dos animais. Os fragmentos de septo nasal e traquéia utilizados no nosso estudo foram oriundos de ratos que foram mantidos por longo período (seis meses) com alta densidade populacional nos sistemas de ventilação utilizados e com diferentes períodos de trocas de cama do que os animais utilizados no trabalho de Teixeira (2000). Por se tratarem de animais de padrão sanitário convencional, o tipo de alojamento pode ter contribuído para o agravamento de doenças respiratórias crônicas (entre elas, a micoplasmose murina). Sabe-se que ratos de padrão sanitário convencional apresentam lesões no trato respiratório provocada pelo *Mycoplasma pulmonis* através da destruição das junções intercelulares, esfoliação celular e decréscimo da atividade ciliar (STATLÄNDER et al., 1991). Além disso, a inalação

de amônia em concentrações comumente encontradas em salas de animais aumentam a gravidade das infecções das vias aéreas (BRODERSON et al., 1976).

Em nosso trabalho, a relação área de cílios por unidade de superfície de membrana basal permitiu comparar o grau de destruição de cílios entre os grupos estudados. Analisando os resultados, não observamos diferença significativa entre os grupos, o que indica que animais mantidos em sistema VMA (apenas ventilação) com até 9 dias de intervalo de troca de cama possuem lesões similares aos animais mantidos em sistema VGD (condicionamento de ar). Sob ponto de vista prático, poderia ser reduzida a troca de cama em um sistema VMA sem prejuízos. Entretanto, os dados sugerem que o grupo IT3 apresenta proporcionalmente maior área de cílios, ou seja, possui uma maior integridade do epitélio ciliado por unidade de membrana basal em relação aos demais grupos.

A integridade do epitélio nasal e da traquéia está diretamente relacionada com a concentração de amônia (NH<sub>3</sub>) no ambiente. A amônia é o principal poluente encontrado em biotérios e o de maior importância pela sua ação nociva. Embora vários autores relataram a relação direta entre a exposição à amônia e o desenvolvimento de processos patológicos no trato respiratório de ratos (SERRANO, 1971; GAMBLE; CLOUGH, 1976; LINDSEY; CORNNER, 1978; CASSEL et al., 1981; TARGOWSKI et al., 1984, CARISSIMI et. al., 2000; TEIXEIRA et al., 2001) ainda é incerta a concentração máxima tolerada pelos animais. Na ausência de estudos específicos, o limite máximo para os animais tem sido o utilizado para o homem, considerando uma jornada de trabalho de 8 horas diárias. Este limite, 25 ppm, foi estabelecido pela American Conference of Governmental Industrial Hygienist (1991). Contudo, sabe-se que existe uma variação na tolerância à amônia devido a características entre as espécies. Por exemplo, morcegos que vivem em cavernas

suportam níveis de amônia de até 1800 ppm e sobrevivem em condições experimentais até concentrações de 5000 ppm. Entretanto, o homem não tolera concentrações de 100 ppm por mais de uma hora (STUDIER et al., 1967). Então, o uso dos limites máximos recomendados de exposição à amônia para o homem pode não refletir a tolerância para outras espécies como roedores, por exemplo.

Embora não exista o limite máximo de tolerância para roedores sabe-se que o aparecimento e a gravidade de lesões no trato respiratório de roedores são influenciados pela concentração de amônia (BRODERSON et al., 1976). Como a concentração de amônia no sistema VMA são menores do que as comumente encontradas no sistema VGD, é bem plausível que as diferenças encontradas são decorrentes da menor exposição à amônia.

A maior quantidade de muco encontrado nos animais do grupo IT7 pode ser creditado a uma maior exposição a particulados em suspensão no ar, proporcionado pelo fluxo de ar unidirecional no interior da gaiola, fato este já constatado anteriormente por Carissimi (1998). Saldiva et al. (1992), constataram que o desenvolvimento de muco parece ser uma resposta geral a adaptações a agressões inalatórias crônicas. Todavia, Teixeira (2000) não encontrou diferença significativa entre propriedades reológicas do muco de animais mantidos em VMA e VGD, porém não foi realizado nenhum trabalho no sentido de quantificar o muco, o que foi realizado no nosso estudo.

A relação área de epitélio por unidade de superfície de membrana basal, apresentou diferença significativa do grupo VGD com os animais mantidos em sistema microambiental com intervalos de troca de cama de 7 e 9 dias (grupos IT7 e IT9). Este resultado, conjuntamente com outros parâmetros avaliados (relação número de núcleos por unidade de superfície de membrana basal e relação muco

ácido por área de epitélio), indica que os grupos IT7 e IT9 apresentam proporcionalmente maior citoplasma do que os animais mantidos no grupo VGD, o que pode ser devido a maior secreção de muco pelo epitélio nos grupos acima mencionados.

A menor prevalência de lesões no septo nasal e traquéia nos animais mantidos no sistema microambiental pode ser decorrente da diminuição de poluentes no microambiente ocasionada pela exaustão do sistema microambiental, como demonstrada anteriormente por CARISSIMI (1998). GAMBLE e CLOUGH (1976) constatou que mesmo em condições ambientais muito controladas uma mudança comumente observada na concentração de amônia presente pode alterar significativamente o quadro histológico normal da traquéia de animais hígidos. A hiperplasia do epitélio traqueal depende da concentração de amônia presente e da duração do tempo pelo qual o animal é exposto a ela.

Desta forma, considerando os resultados da análise morfométrica de septo nasal e traquéia, é possível sugerir que o intervalo de trocas de cama a ser adotado para o sistema VMA pode ser aumentado. Reeb-Whitaker et al.(2001), demonstraram que trocas de cama quinzenais em sistema de ventilação microambiental com renovação de ar de 60 trocas completas de ar por hora (ACH) proporcionam melhores condições sanitárias para os animais ao mesmo tempo que ocorre uma racionalização do manejo dos animais.

Os resultados apresentados consolidam o sistema VMA como mais adequado para a manutenção de animais de laboratório, de padrão sanitário convencional, pois proporciona melhores condições de alojamento do que o sistema VGD, o que já tinha sido constatado anteriormente por Teixeira (1995), Chaguri (1998) e Carissimi (1998).

## **6 - CONCLUSÕES**

## **6- CONCLUSÕES:**

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

1- Com relação a área de cílios, embora não sendo observada diferença significativa entre os demais grupos, os dados sugerem que o grupo IT3 apresenta proporcionalmente maior volume de cílios, ou seja, maior integridade do epitélio ciliado em relação aos demais grupos.

2- Os animais mantidos em ambiente com temperatura controlada (sistema VGD) apresentaram maior celularidade do que animais mantidos apenas sob ventilação (sistema VMA).

3- O grupo com trocas de cama a cada sete dias, teve menos alterações na traquéia do que os demais grupos mantidos em VMA e VGD.

4- Os animais mantidos no sistema VMA, independente do intervalo de trocas de cama a que foram submetidos, apresentaram menor intensidade de lesões no septo nasal e na traquéia do que os animais mantidos em VGD. A maior integridade epitelial pode ser relacionado com a qualidade das condições ambientais fornecida aos animais alojados no sistema VMA.

5- O sistema de VMA confirmou ser mais apropriado para a manutenção de ratos em experimentação.

## **7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALLANDER,C; ABEL, E., 1973 apud McSHEEHY, T. ed., 1976, p.78.

ALSCHULER,J.H. Air treatment for research animal housing. **Laboratory Animal Care**, v. 13, n. 3, p. 321-31, 1963.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. Documentation of the threshold limit values and biomedical exposure indexes. Cincinnati, Estados Unidos. Annals of American conference of governmental industrial hygienist, p. 58-59, 1991.

ASHRAE, American Association of heat, refrigerating and air conditioning engineering. **ASHRAE Transactions**, v. 78, n. 10, 1997.

BESCH, E.L. Definition of laboratory animal environmental conditions. In: MOBERG, G.P. ed., **Animal Stress**. Bethesda, American Physiological Society, 1985. c. 17., p.297-315.

BESCH, E. L. Animal Facility Ventilation Air Quality and Quantity. **ASHRAE Transactions: Symposia**, vol. 98, pt2, 1992.

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.,CHAGURI,L.C.A.A.;TEIXEIRA,M.A.;MORI,C.M.C.;MACCHIONE,M.; SANT'ANNA,E.T.G.;SALDIVA,P.H.N.;SOUZA,N.L.;MERUSSEJ.B.L. 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.

CCAC – CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guide to the care and use of experimental animals**. Ontario, 1984, v.2, p. 150-152.

CHAGURI, L.C.A.G. Ventilação Microambiental para Biotérios: Estudo Experimental em Ratos (*Rattus norvegicus*). **Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, 83 p. São Paulo, 1998.

CHAGURI,L.C.A.A.; SOUZA,N.L.; TEIXEIRA,M.A.; MORI,C.M.C.; CARISSIMI,A.S., MERUSSE, J.B.L. Evaluation of reproductive indices in rats (*Rattus norvegicus*) housed under na intracage ventilation system. **Contemporary Topics**, v. 40, n. 5, p. 25-30, 2001.

CHANCE, M.R.A. Factors influencing the toxicity of sympathomimetic amines to solitary mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 79, p. 127-32, 1943.

- 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.
- CLOUGH, G.; WALLACE, J.; GAMBLE, M.R.; MERRYWEATHER, E.R.; BAILEY, E. A positive, individually ventilated caging system: a local barrier system to protect both animals and personnel. **Laboratory Animals**, v. 29, p. 139-151, 1995.
- CORNING, B.F.; LIPMAN, N.S. A comparison of rodent caging systems based on microenvironmental parameters. **Laboratory Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 498-503, 1991.
- 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.
- EVELEIGH, J.R. Murine cage density: cage ammonia levels during the reproductive performance of an inbred strain and two outbred stocks of monogamous breeding pairs of mice. **Laboratory Animals**, v. 27, p. 156-160, 1993.
- FRANCIS, L. General Hazards. In: SEAMER, J.H.; WOOD, M. **Safety in the animal house**. 2 ed. London: Laboratory Animals, 1981. p. 1-10.
- 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.
- GORDON, C. J. Temperature Regulation in laboratory rodents. Nova Iorque, Cambridge University Press, 1993. 276 p.
- GORTON, R.L. System design and energy conservation considerations. **ASHRAE Transactions: symposia**, v. 81, part 2, p. 572-78, 1975.
- GORTON, R.L.; WOODS, J.E.; BESCH, E.L. System load characteristics and estimation of annual heat loads for laboratory animal facilities. **ASHRAE Transactions: Symposia**, v. 82, part 1, p. 107-12, 1976.
- HARDY, R.N. **Temperatura e vida animal**. São Paulo, EDUSP, 1981, p. 26-36.
- HASEGAWA, M.; KURABAYASHI, Y.; ISHII, T.; YOSHIDA, K.; UEBAYASHI, N.; SATO, N.; KUROSAWA, T. Intra-cage Air change rate on forced-air-ventilated micro-isolation system – environment within cages: carbon dioxide and oxygen concentration. **Experimental Animals**, v. 46, n. 4, p. 251-257, 1997.
- HUERKAMP, M.J. Ivermectin eradication of pinworms from rats kept in ventilated cages. **Laboratory Animal Science**, v. 43, n. 1, p. 86-90, 1993.
- HUNSKAAR, S.; FOSSE, R.T. Allergy to laboratory mice and rats: a review of the pathophysiology, epidemiology and clinical aspects. **Laboratory Animals**, v. 24, p. 358-74, 1990.
- 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.
- JONES, R.B.; KACERGIS, J.B.; MacDONALD, M.R.; McKNIGHT, F.T.; TURNER, W.A.; OHMAN, J.L.; PAIGEN, B. The effect of relative humidity on mouse allergen

levels in an environmentally controlled mouse room. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 56, n. 4, p. 398-401, 1995.

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.; YOSHIDA, K.; OKAMOTO, M.; TAJIMA, M. Invention of na air forced ventilated micro-isolation cage and rack system – envoronment 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.

LEMONS,M.;LICHTENFELS,A.J.F.C.;AMARO,JR.E.;MACCHIONE,M.;MARTINS,M.<sup>a</sup>;KING,M.;BÖHM,G.M.;SALDIVA,P.H.N.Quantitative Pathology of Nasal Passages in Rats Exposed to Urban Levels of Air Pollution. **Environmental Research** 66, p.87-95, 1994.

LINDSEY, J.R. & CONNER, M.W. Influence of cage sanitization frequency on intracage ammonia concentration and progression of murine respiratory mycoplasmosis in the rat. **Zentralblatt für Bakteriologie Parasitunkunde, Infektions Krankheiten und Hygiene**, v. 21A, p. 215, 1978.

LIPMAN, N.S.; CORNING, B.F.; COIRO, Jr, M.A. The effects of intracage ventilation microenvironmental condition in filter-top cages. **Laboratory Animals**, v. 26, p. 206, p.206-10, 1992.

LIPMAN, N.S.; CORNING, B.F.; SAIFUDDIN, M.D. Evaluation of isolator caging system for protection of mice against challenge with mouse hepatitis virus. **Laboratory Animals**, v. 27, p. 134-40, 1993.

LORUSSO, J.R.; MOFFAT, S; OHMAN Jr, J.L. Immunological and biochemical properties of the major mouse urinary allergen (Mus m1). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, p. 928- 37, november, 1986.

LUNDGREN, J.D. Mucus production inthe lower airways: a review of experimental studies. **Danish Medical Bulletin**, v. 39, supp. 4, p. 289-303, 1992.

MACCHIONE, M.; KING, M.; LORENZI-FILHO, G.; GUIMARÃES, E.T.; ZIN, W.A.; BÖHM, G.M.; SALDIVA, P.H.N. 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.

McGARRITY, G.J.; CORIELL, L.L. Mass air flow cabinet for control of airborne infection of laboratory rodents. **Applied Microbiology**, v. 26, n.2, p.167-72, 1973.

McGARRITY,G.J.; CORIELL. L.L. Maintenance of axenic mice in open cages in mass air flow. **Laboratory Animal Science**, v. 26, n. 5, p. 746-50, 1976.

McSHEEHY, T. (ed). **Control of the animal house environment**. London: Laboratory Animals, 1976. 335 p.

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.

MORGAN, K.T.; JIANG, X.; PATTERSON, D.L.; GROSS, E.A. The Nasal Mucociliary Apparatus: Correlation of Structure and Function in the Rat. **Am. Rev. Respir. Dis.** **1984**; **130**:275-281.

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.

PERKINS, S. E.; LIPMAN, N. S. Characterization and quantification of microenvironmental contaminants in isolator cages with a variety of contact beddings. **Contemporary Topics**, v. 34, n. 3, p. 93-98, 1995.

PERKINS, S. E.; LIPMAN, N. S. Evaluation of microenvironmental conditions and noise generation in three individually ventilated rodent caging systems and static isolator cages. **Contemporary Topics**, v. 35, n. 2, p. 61-65, 1996.

REEB, C.K.; JONES, R.B.; BEARG, D.W.; BEDIGIAN, H.; MYERS, D.D.; PAIGEN, B. 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, C.K.; JONES, R.B.; BEARG, D.W.; BEDIGIAN, H.; PAIGEN, B. Impact of room ventilation rates on mouse cages ventilation and microenvironment. **Contemporary Topics**, v. 36, n. 1, p. 74-79, 1997.

REEB-WHITAKER, C.K., PAIGEN, B.; BEAMER, W.G., BRONSON, R.T.; CHURCHILL, G.A.; SCHWEITZER, I.B. & MYERS, D.D. 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.

ROSSI, P.R.; TEIXEIRA, M.A.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.B.L. Obtenção de fluxo unidirecional de ar em sistema de ventilação microambiental (VMA) para Biotérios. **IV Congresso Brasileiro de Animais de Laboratório**. Resumo 16, p. 35, Guarujá, SP, 1994.

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.; KING, M.; DELMONTE, V.L.C.; MACCHIONE, M.; PARADA, M.A.C.; DALIBERTO, M.L.; SAKAE, R.S.; CRIADO, P.M.P.; SILVEIRA, P.L.P.; ZIN, W.A.; BÖHN, G.M. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. **Environmental Research**, v. 57, p. 19-33, 1992.

SCHOEB, T.R.; DAVIDSON, M.K.; LINDSEY, J.R. Intracage ammonia promotes growth of Mycoplasma pulmonis in the respiratory tract of rats. **Infection and Immunity**, v. 38, n. 1, p. 212-217, 1982.

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.

SINHORINI, I.L.; TEIXEIRA, M.A.; ROSSI, P.R.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.B.L. Redução da incidência de lesões pulmonares em camundongos mantidos sob ventilação microambiental (VMA). **VIII Semana Científica do Departamento de Patologia - FMVZ, USP**, São Paulo, Novembro de 1994.

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.

STATLÄNDER, C.T.K.H.; WATSON, H.L.; SIMECIA, J.W.; CASSEL, G.H. Cytopathic effects of *Mycoplasma pulmonis* in vivo and in vitro. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 4201-4211, 1991.

STUDIER, E.H.; BECK, L.R.; LINDEBORG, R. Tolerance and initial metabolic response to ammonia intoxication in selected bats and rodents. **Journal of Mammalogy**, v. 48, p. 564-572, 1967.

TARGOWSKI, S.P.; KLUCISKI, W. BABIKER, S.; NONNECKE, B.J. Effect of ammonia on in vivo and in vitro immune responses. **Infection and Immunity**, v. 43, p. 289-93, 1984.

TEIXEIRA, M.A. Ventilação Microambiental para Biotérios: Estudo Experimental em Camundongos (*Mus musculus*). **Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, 97 p. São Paulo, 1995.

TEIXEIRA, M.A.; SINHORINI, I.L.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.L.B. 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. Ventilação microambiental para biotérios: avaliação dos mecanismos de defesa pulmonar e dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos (*Rattus norvegicus*). **Tese ( doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, 116 p. São Paulo, 2000.

TEIXEIRA, M.A.; SALDIVA, P.H.N.; SOUZA, N.L.; SINHORINI, I.L.; MERUSSE, J.L.B. Reduction of atmospheric ammonia and incidence of pulmonary lesions in mice kept in plenum chamber microenvironmental ventilation system. **Scand. J. Lab. Anim. Sci.**, nº 3, vol. 28; 2001.

TORREIRA, R.P. **Salas limpas: projeto, instalação e manutenção**. São Paulo: Hemus editora, 1991. P. 31-75.

TU, H.; DIBERADINIS, L.J.; LIPMAN, N.S. Determination of air distribution, exchange, velocity and leakage in three individually ventilated rodent caging systems. **Contemporary Topics**, v. 36, n. 1, p. 69-73, 1997.

TURNER, W.A.; McKNIGHT, F.T.; JONES, R.B.; BARTH, J.M.; PAIGEN, B.J.; OHMAN, J.L.; MacDONALD, M.R. Air quality evaluations of animal room facilities utilized for the production of laboratory mice. **ASHRAE Transactions:Symposia**, v. 98, part 2, p. 262-71, 1992.

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.

WEIHE, W.H. The significance of the physical environment for the health and state of adaptation of laboratory animals, p. 353-378. IN: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Defining the laboratory Animal**, National Academy of Sciences. Washington D.C., 1971, p. 353-378.

WHITE, W.J. & MANS, A.M. Effect of breeding changes and brain ammonia level in normal rats and rats with portocaval shunts. **Laboratory Animal Science**, v. 34, p. 49-52, 1984.

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.; OBARA, T.; FUKUYAMA, N.; UEDA, T. Evaluation of a one-way airflow system in an animal room based on counts of airborne dust particles and bacteria and measurements of ammonia levels. **Laboratory Animal Science**, v. 31, n. 3, p. 251-8, 1989.

YAMAUCHI, C.; TAKAHASHI, H.; ANDO, A.; YAMAUCHI, N.; NOMURA, T. Influence of environmental temperature on acute toxicity in laboratory mice. **Bulletin of the Experimental Animals**, v.16, p. 3-8, 1967.

YOSHIDA, K.; OKAMOTO, M.; TAJIMA, M.; KUROSAWA, T. Invention of forced-air-ventilated micro-isolation cage and rack system – environment within cages: Temperature and ammonia concentration. **Experimental Animals**, v. 43, n. 5, p. 703-710, 1995.

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.