



Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança

Politi, F.A.S.¹; Pietro, R.C.L.R.¹; Salgado, H.R.N.^{1*}

¹Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Recebido 03/06/2008 - Aceito 18/07/2008

RESUMO

O emprego de animais de laboratório em conjunto com estudos realizados em humanos fornece uma base para a compreensão de vários processos fisiológicos e patológicos importantes. Além disso, os resultados de estudos experimentais possibilitam uma melhor compreensão e segurança para o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas na clínica médica. Por se tratar de material biológico vivo, devemos garantir sua integridade física levando-se em consideração as contaminações microbiológicas, a genética, a nutrição e a correta manipulação, a fim de se evitar que ocorram conclusões inválidas nos experimentos ou que se aumente desnecessariamente o número de animais utilizados. Em paralelo às preocupações e legislações sobre o uso de animais de laboratório, desenvolveu-se também a preocupação com o bem estar e a segurança das pessoas que manuseiam os animais de laboratório, uma vez que estas correm riscos de adquirirem doenças ocupacionais pela presença de contaminações zoonóticas ou por desenvolvimento de alergias. A prevenção requer a aplicação de modernos avanços tecnológicos no desenho do biotério e nas rotinas de trabalho. Infelizmente poucos estabelecimentos do país apresentam recursos humanos com formação apropriada e infra-estrutura básica de pesquisa que inclua os centros de criação de animais de laboratório, equivalentes àqueles existentes nos Estados Unidos e Europa.

Palavras-chave: animais de laboratório; legislações; biotério; segurança.

BREVE HISTÓRICO

Há séculos os animais são utilizados pelo homem, seja na alimentação, na força física ou na evolução da ciência na busca de novas terapias. Neste sentido, a melhorias e a padronização das condições de manutenção e de experimentação tornam-se fatores imprescindíveis para o controle dos resultados e o avanço das técnicas empregadas. Neste artigo é realizada uma revisão sobre biotérios, dando ênfase à caracterização, à legislação e

aos critérios de biossegurança, com o intuito de orientar os profissionais e alunos que atuam nesta área e destacar a importância dos cuidados com os animais.

As pesquisas científicas na área biológica do conhecimento contribuem de forma irrefutável para o bem estar não só do homem como também dos animais. Porém, as informações necessárias para o avanço de determinadas pesquisas não podem ser obtidas somente pela observação e pelo registro daquilo que normalmente acontece e, por isso, a experimentação científica é absolutamente necessária para que o ciclo do conhecimento se efetue. O uso de animais com objetivos científicos é uma prática comum, há muito tempo utilizado, e para que seja moralmente aceitável, é necessário buscar uma postura ética em todos os momentos do desenvolvimento dos estudos (Paiva et al., 2005).

Atualmente, apesar de todos os esforços da comunidade científica a fim de reduzir e substituir a utilização de animais de laboratório na experimentação biológica, ainda não foi possível abandonar o uso deles na avaliação de segurança dos mais diferentes produtos (CCAC, 1993; FELASA, 1999; CPCSEA, 2003; Marona & Lucchesi, 2004). Assim sendo, a preocupação com o bem-estar animal conduziu experimentos para otimizar condições de manuseio objetivando a melhor padronização de parâmetros necessários para a realização dos ensaios biológicos por nosso grupo de estudo (Marona & Lucchesi, 2003; Marona & Lucchesi, 2004; Chorilli et al., 2007). Marona & Lucchesi (2003) descrevem a otimização da técnica clássica para a determinação da motilidade intestinal, diminuindo o tempo de jejum a que os animais são submetidos, objetivando assim a minimização do estresse do animal. Os mesmos autores desenvolvem, em 2004, um novo ensaio de trânsito intestinal em camundongos, visando o bem-estar animal, no qual não há a necessidade de sacrificar os camundongos para a avaliação da motilidade intestinal dos produtos analisados.

Chorilli et al. (2007) realizam o compilamento bibliográfico sobre o emprego de camundongos na experimentação animal, abordando sua biologia geral, fisiologia de reprodução, sistemas de criação, genética, habitação, alimentação, manejo, dor e eutanásia, técnicas de risco desenvolvidas na experimentação, coleta de sangue, experimentos farmacológicos e toxicológicos. Embora

*Autor correspondente: Hérica Regina Nunes Salgado - Departamento de Fármacos e Medicamentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, UNESP - Rodovia Araraquara/Jaú, km 1 - CEP: 14801-902 - Araraquara - SP, Brasil - Telefone: (16) 3301-6967 Fax: (16) 3322-0073 - e-mail: salgadoh@fcar.unesp.br

tendências atuais preconizam a utilização de métodos alternativos (estudos *in vitro*, culturas de células, etc.), os modelos animais, como os camundongos, apresentam como principal vantagem o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo, fato que não é conseguido com outros métodos, o que ainda possibilita o seu emprego em pesquisas científicas.

A publicação do livro “A Origem das Espécies” de Charles Darwin, em 1859, estabeleceu os pressupostos do vínculo existente entre as diferentes espécies animais em um único processo evolutivo. Desta forma, a teoria de Darwin possibilitou a extrapolação dos dados obtidos em pesquisas com modelos animais para seres humanos (Paiva et al., 2005). Durante muitos anos as pesquisas que utilizam modelos animais sofreram poucos questionamentos, devido ao seu alto impacto social, tais como as que possibilitaram o desenvolvimento das vacinas contra raiva, tétano e difteria, além dos interesses econômicos das poderosas indústrias farmacêuticas. Por outro lado, neste mesmo período surgiram inúmeras sociedades de proteção aos animais (Paiva et al., 2005). Em 1959, o zoologista William M. S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch publicaram um livro, onde propuseram um novo horizonte na utilização de animais para experimentação. Os autores estabeleceram o conceito dos chamados três “Rs” da pesquisa com animais: *Replace* (substituir), *Reduce* (reduzir) e *Refine* (refinar). Tal proposta não impediria a utilização de modelos animais em experimentação, mas realizaria uma adequação no sentido de humanizá-la (Paiva et al., 2005).

Em 1975, com a publicação do livro “Animal Liberation”, escrito pelo professor australiano Peter Singer, houve o ressurgimento do debate sobre a utilização de animais em pesquisas e em outras atividades, causando muita polêmica, sobretudo por descrever as condições as quais os animais eram submetidos pela indústria de cosméticos e no processo de produção de alimentos (Paiva et al., 2005). No dia 27 de janeiro de 1978 a Assembléia da UNESCO, realizada em Bruxelas, influenciada pela grande comoção gerada pelo livro do professor Singer, proclamou a Declaração Universal dos Direitos dos Animais (Schneider & Souza, 2003).

No Brasil, ainda hoje, não existe uma legislação que efetivamente regulamente a utilização de animais para fins didáticos e de pesquisa. Esta lacuna interfere de forma incisiva na conduta ética dos profissionais envolvidos em experimentação e ainda atinge o próprio bem-estar dos animais. Segue valendo, apesar de não ter sido devidamente implementada, a Lei Federal nº 6.638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a prática didático-científica da *visissecção* de animais (Paiva et al., 2005). O Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), entidade filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)*, procurando colaborar no aprimoramento das condutas dirigidas à experimentação em animais no país, elaborou artigos referentes aos Princípios Éticos da Experimentação Animal, reforçando a Lei Federal 6638.

Desde 1995 podemos dizer que o Brasil ingressou efetivamente na era das pesquisas e no desenvolvimento

dos Organismos Geneticamente Modificados, conhecidos como produtos transgênicos (Oda, 2001). As instituições produtoras de imunobiológicos e fármacos necessitam de grande quantidade de animais, livres de patógenos específicos, para serem utilizados no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, pois o produto final, por exigências das farmacopéias e de manuais da WHO deve ser testado *in vivo* (Silva et al., 2003). Além das grandes indústrias, universidades e outros centros de pesquisa também requerem animais de boa procedência para a condução de seus experimentos. Para suprir esses centros de pesquisa, surgiram os biotérios, que são definidos como áreas destinadas à criação e à manutenção de animais de laboratório em condições sanitárias, dentro de padrões rigorosamente estabelecidos, respeitando as normas éticas e as leis de manipulação e *visissecção* (Cardoso, 2001). Pode-se separar os biotérios segundo a finalidade a que se destinam. Os biotérios de criação são aqueles onde são produzidas e mantidas as matrizes das linhagens, com controle rigoroso da saúde dos animais e esquemas especiais de acasalamento para manutenção das características genéticas, assegurando os padrões de qualidade. Os biotérios de produção são aqueles onde se criam grandes quantidades de animais para atender às pesquisas, recebendo matrizes dos biotérios de criação e, por fim, os biotérios de experimentação que se destinam a receber os animais dos biotérios de produção para utilizá-los na experimentação, funcionando como infectório (Cardoso, 2001).

Há vários anos tramita o projeto de lei 1153/95 no Congresso Nacional, que regulamenta o uso de animais em experimentos científicos em todo o território nacional, revogando, conseqüentemente, a Lei de *Visissecção*. Este projeto de lei vem sendo amplamente discutido pela comunidade científica e contempla aspectos amplamente discutidos pelos comitês de ética nas instituições que utilizam animais, como incentivo à aplicação do conceito 3 R's da pesquisa e com penalidades aos que não cumprirem a lei.

É extremamente importante que existam regulamentações mais eficazes para a criação e o uso de animais nas atividades de ensino e de pesquisa. No entanto, a academia vem se mostrando preocupada com aspectos que possam proibir pesquisa e impedir o avanço científico e tecnológico.

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ANIMAIS

A disponibilidade de animais de laboratório por si só não traduz a importância que representam nos resultados dos experimentos em que estão envolvidos. É preciso observar que determinadas características são fundamentais para que os animais desempenhem suas funções satisfatoriamente. Os animais produzidos com a finalidade de serem utilizados em pesquisa devem possuir características genéticas e sanitárias avaliadas rotineiramente, visando à certificação de padrões pré-estabelecidos (Majerowicz, 2005).

De acordo com a caracterização genética dos animais, existem dois tipos de linhagens: “inbred” e

“outbred”. As criações chamadas de “outbred” são caracterizadas como linhagens geneticamente heterozigotas para muitos dos pares de alelos e mantidas em sistemas de cruzamento randômico. As criações chamadas de “inbred” são mantidas por sistema de acasalamento entre irmãos por mais de 20 gerações, sendo homozigotas para quase todos os pares de genes alelos (Jonas, 1976; Festing, 1993). Uma linhagem isogênica deve ter o índice de homozigose entre pares de genes alelos de pelo menos 98,6%, que é o mínimo requerido para ser considerada uma linhagem consanguínea (Afif & Rosenkranz, 1990).

As características genéticas são de grande importância no que se refere à seleção e ao manejo dos animais para uso em colônias de reprodução e em pesquisa biomédica. A variabilidade genética pode ser monitorada por meio de simulações computadorizadas, marcadores bioquímicos, de DNA, imunológicos ou análises genéticas quantitativas de variáveis fisiológicas (NRC, 1976).

Linhagens de animais de experimentação, quando padronizadas, atuam como ferramentas capazes de simular as complexas interações entre órgãos e sistemas, possibilitando a compreensão *in vivo* dos eventos relacionadas ao desenvolvimento da doença. Porém, experimentos realizados em animais contaminados são profundamente alterados, comprometendo a exatidão dos resultados, dificultando sua interpretação e tornando o animal inadequado como modelo experimental (Passos, 2003).

CARACTERIZAÇÃO SANITÁRIA

A preocupação com as medidas de higiene e combate de patógenos no trato com animais de experimentação nem sempre foi prioridade. Até 1960 pouca importância era dada ao controle de doenças, pois, na verdade, pouco se sabia sobre a ocorrência natural de doenças em roedores que podiam afetar o resultado dos estudos. A mortalidade significativa de animais de laboratório antes e durante o processo de experimentação por doenças, ocorridas naturalmente, era aceita como parte do processo experimental. Já a partir dos anos 60, foi estabelecido o uso da técnica de cesárea asséptica como um meio de repor estoques de animais infectados com filhotes não-infectados. Este processo teve muito sucesso na eliminação de patógenos que não atravessam a placenta, eliminando assim a transmissão vertical (Baker, 1998).

A partir dos 80 houve uma redução significativa da incidência de patógenos em animais de experimentação. A utilização de testes sorológicos de anticorpos específicos e, subsequentemente, a eliminação dos animais contaminados contribuíram para o avanço nos métodos de criação animal (Baker, 1998).

Atualmente, os critérios na pesquisa científica exigem animais com padrão sanitário conhecido o que tem contribuído para que instituições nacionais invistam na melhoria de seus biotérios. A padronização microbiológica tem diminuído o número de animais usados pela redução das variações dentro e entre os grupos de testes,

contribuindo, portanto, para o bem estar e a saúde dos animais de laboratório, reduzindo os riscos para a saúde humana devido a zoonoses (FELASA, 1999). Assim, há uma tendência de se utilizar animais de laboratório de acordo com os seguintes padrões sanitários (Figura 1):

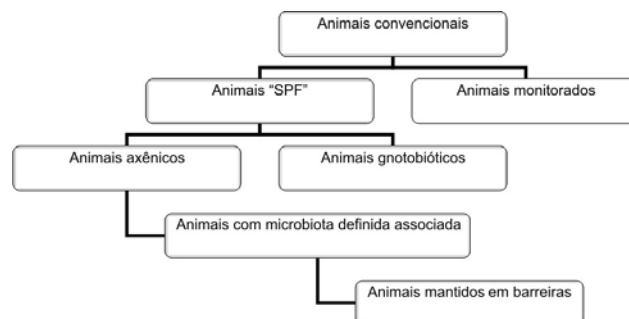


Figura 1. Padrões sanitários de criação

- animais convencionais: criados em biotérios que não possuem barreiras sanitárias adequadas para impedir introdução de microrganismos. São usualmente criados em sistemas de gaiolas abertas e em condições de livre acesso, estando, por isso, sempre sujeitos a novas infecções (NRC, 1976; Górska, 2000; CPCSEA, 2003; IVIS, 2003).
- animais livres de microrganismos patogênicos específicos (*specific pathogen free* - SPF): são isentos de organismos patogênicos definidos que causam doenças clínicas ou subclínicas ou, ainda, potencialmente patogênicos a uma determinada espécie animal. Esse padrão de saúde dependerá de uma lista individual de exclusão de microrganismo (Górska, 2000; IVIS, 2003). Os animais SPF são mantidos em biotérios com eficientes barreiras sanitárias ou são alojados em equipamentos que lhes garantam seu padrão microbiológico. Sua microbiota é controlada, de forma que alberguem somente agentes não patogênicos à espécie (CPCSEA, 2003).
- animais axênicos: são derivados por histerectomia, criados e mantidos em isoladores com técnicas para animais livres de microrganismos e livres de todas as formas associadas de vida (NRC, 1976; Górska, 2000; CPCSEA, 2003; IVIS, 2003).
- animais gnotobióticos: criados e mantidos como os animais axênicos, porém apresentam alguma forma de vida adicional. Essas podem ser poucas em números e não patogênicas (Górska, 2000; IVIS, 2003).
- animais com microbiota definida associada: são animais axênicos os quais foram intencionalmente associados com um ou mais microrganismos (Górska, 2000; IVIS, 2003).
- animais mantidos em barreiras: são animais originalmente flora definida que foram removidos dos isoladores e alojados em biotério com barreiras sanitárias. Assim, os animais são repetidamente testados para monitorar a presença desses microrganismos deliberadamente inoculados e a presença de organismos acidentalmente adquiridos (Górska, 2000; IVIS, 2003).

- animais monitorados: alojados em sistema de barreira de baixa segurança e que, por monitoramento periódico, revelam-se livres da maioria de patógenos. Outros não patógenos associados são desconhecidos (Górska, 2000).

A qualidade sanitária em um biotério é imprescindível para seu funcionamento regularizado. O risco de introdução de uma infecção em colônias de roedores é sempre muito alto no recebimento de novos animais. O recebimento inadvertido de um único animal infectado pode causar uma doença epidêmica acarretando perda de tempo e de dados de pesquisa, já que a eliminação da contaminação de um patógeno no biotério é um processo custoso e demorado. A introdução de novos animais é prática comum na realização de determinados projetos ou pesquisas, fazendo-se necessário minimizar os riscos por meio de exames do padrão de saúde para todos os novos animais (IVIS, 2003). A ocorrência de enfermidades nos animais residentes pode ser evitada por precauções que devem ser tomadas na origem dos animais (NRC, 1976; FELASA, 1999; IVIS, 2003). Assim, a qualidade começa com a definição do padrão microbiológico e parasitário do animal. O ideal é que os biotérios de criação possuam, em suas instalações, barreiras sanitárias e programas de vigilância de saúde que certifiquem que suas colônias são livres de patógenos específicos e quais microrganismos são monitorados (Jonas, 1976; IVIS, 2003).

Na interpretação do padrão microbiológico dos animais de laboratório, porém, infecção não é sinônimo de doença. A infecção simplesmente indica a presença do microrganismo, que pode ser patogênico, oportunista ou comensal, sendo os dois últimos mais numerosos. Poucos microrganismos, encontrados hoje em animais de laboratório, determinam manifestações clínicas. O pesquisador deve entender que as doenças provocadas por microrganismos nem sempre expressam manifestações clínicas e mesmo assim, podem interferir nos resultados do experimento. Portanto, animais considerados saudáveis podem ser inadequados para pesquisas devido a falhas de avaliação dos sinais clínicos locais, sistêmicos ou comportamentais, causados pela presença de vírus, bactérias e parasitos que possam estar infectando ou parasitando o animal (Baker, 1998). Muitas infecções em roedores são subclínicas e modificações nos resultados de pesquisas ocorrem por infecções naturais com ausência de manifestações clínicas (FELASA, 1999).

Para assegurar os padrões microbiológicos dos animais e do ambiente do biotério, nem sempre é confiável a certificação sanitária apresentada pelo fornecedor. A quarentena cumpre um papel de relevância em situações em que o padrão microbiológico de novos animais pode acarretar danos à saúde dos outros residentes, e dos indivíduos envolvidos no ambiente do biotério (Rehg & Toth, 1998). Dessa forma a quarentena consiste na manutenção de animais recém-adquiridos em instalações isoladas até que se determine o estado de saúde e, possivelmente, o perfil microbiológico destes (NRC, 1976; CCAC, 1993). Têm ainda, como propósitos, a segregação do animal com

suspeita ou reconhecida infecção e a separação de espécies incompatíveis (USA, 1971). O tempo de quarentena e a estratégia de exames dependem da espécie animal, a origem da colônia, o modo de transporte, do sistema de barreiras de segurança, dos exames de vigilância e da destinação dos animais nas novas instalações (Hesler & Moreland, 1984; IVIS, 2003).

Um fator importante a considerar na segurança microbiológica dos animais, técnicos e ambientes em biotérios diz respeito a materiais biológicos, particularmente quando de origem externa, que devem ser monitorados para prevenir a introdução de agentes vetores, que podem influenciar a saúde humana, de outros animais ou resultados da própria experimentação animal (Small, 1984; FELASA, 1999). A adoção de barreiras sanitárias adequadas, para os diversos tipos de acessos em um biotério, deve ser priorizada, a fim de minimizar os riscos de contaminação (FELASA, 1999).

CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL

Devemos considerar que a condição sanitária dos animais é determinada não somente pela origem destes, mas também pelo meio ambiente em que estão vivendo, afetando diretamente suas respostas biológicas, fisiológicas e comportamentais. Sendo assim, os biotérios devem ser projetados a atender as recomendações para a criação ou manutenção de animais e para minimizar os efeitos do meio ambiente nas variáveis do animal (WHO, 2001; Chorilli et al., 2007). Um bom programa de gerenciamento deve incluir instalação, ambiente e cuidados que permitam ao animal crescer, desenvolver, reproduzir, manter boa saúde, ter bem-estar e minimizar as variações que podem afetar resultados de pesquisa (NIH, 2002). Um erro comum na pesquisa básica é assumir que os animais – utilizados em diferentes laboratórios ou sobre variadas condições ambientais no mesmo laboratório – são similares em suas respostas (Lang & Vessel, 1976). Embora o ideal seja um ambiente constante em todos os parâmetros recomendados, isso é pouco provável de ser alcançado (De Luca et al., 1996).

O microambiente diz respeito ao espaço físico imediatamente próximo ao animal, ou seja, a gaiola, com parâmetros próprios para temperatura, umidade relativa, composição de gases e partículas do ar. O macroambiente, por sua vez, refere-se ao ambiente físico secundário – como, por exemplo, a sala, o estábulo ou habitat externo. Embora ambos estejam relacionados, o ambiente na gaiola pode ser bem diferente do secundário e sofre influência pelo desenho dos dois ambientes (NRC, 1976). Os fatores físicos ambientais que mais influenciam as respostas biológicas dos animais são a temperatura, a umidade relativa, a ventilação, a intensidade de luz, o fotoperíodo, os ruídos, os gases e as substâncias particuladas (Lang & Vessel, 1976; Besch, 1980; Chorilli et al., 2007).

A maioria dos animais de laboratório tolera a mesma faixa de temperatura do homem, contudo a temperatura da sala de animais tende a ser mantida entre a ideal para os

animais e a mais confortável para o trabalho. Requerimentos experimentais, condições de saúde e conforto dos animais devem ter preferência sobre a necessidade de conforto do homem nas instalações de animais. O controle de temperatura, para sala de animais, deve possuir ajustes individuais, visando os objetivos do estudo, experimentação ou criação. Larga variação de temperatura é mais prejudicial que uma temperatura constante próxima a um dos extremos da faixa de tolerância (Majerowicz, 2000a). Mudança na temperatura ambiental resultará em alterações compensatórias que afetaram o padrão metabólico, circulação periférica, atividade e comportamento (De Luca et al., 1996; Majerowicz, 2000a).

Geralmente, a exposição de animais não adaptados à temperatura, elevada ou baixa, sem acesso a abrigos ou a outros mecanismos de proteção, pode induzir a enfermidades que oferecem risco à vida. Há de se ressaltar, também, que os animais podem se adaptar aos extremos por meio de mecanismos comportamentais, fisiológicos e morfológicos, mas tal adaptação requer tempo e pode alterar os resultados do protocolo, ou, de outro modo, afetar o desempenho e a saúde destes animais (Lang & Vessel, 1976).

Os animais de laboratório, a maioria homeotérmicos, mantêm a temperatura corporal constante. O calor do corpo é perdido por três principais processos físicos: radiação, convecção por condução e evaporação (De Luca et al., 1996). Alterações de temperatura podem influenciar resultados experimentais. Essa deve ser constante ao longo da experimentação. Deve ser lembrado que a temperatura no interior das gaiolas, normalmente, é superior em alguns graus que a do ambiente e varia em função do volume da gaiola e números de animais alojados (Majerowicz, 2005).

O controle da umidade relativa do ar também é necessário, ainda que não de modo tão rigoroso e eficiente quanto da temperatura (NRC, 1976; De Luca et al., 1996). O excesso de calor, na maioria das espécies animais, é compensado pelo aumento do ritmo respiratório, sobretudo nas espécies de laboratório, que são incapazes de sudorese. Contudo, se o ar inspirado possuir alto índice de umidade, afetará a capacidade do animal no ajuste da temperatura corporal. Cumpre ainda observar que os animais homeotérmicos mantêm um contínuo processo fisiológico envolvendo os líquidos corpóreos, nutrientes e oxigênio. Esses animais estão constantemente perdendo calor, umidade, dióxido de carbono, entre outros produtos metabólicos, que irão se acumular no ambiente se a sala não possuir ventilação adequada. O acúmulo de amônia, por exemplo, que é derivada da ação de bactérias urease positivas sobre as excretas, pode afetar o sistema respiratório dos animais propiciando infecções secundárias (Majerowicz, 2000b). Flutuações e extremos na umidade relativa podem, por conseguinte, propiciar o aparecimento de doenças, principalmente respiratórias, bem como alterações no consumo de ração e água (De Luca et al., 1996).

Animais, como os roedores, que são ativos ao entardecer e à noite são sensíveis à luz com alta intensidade. O exemplo mais citado na literatura é o efeito destrutivo da retina de ratos albinos, que em extremo podem ficar

cegos. A iluminação deve propiciar boa visibilidade e ser uniforme. Intensidade de luz de ordem de 200 Lux é adequada à reprodução e assegura um comportamento normal na maioria dos roedores (Majerowicz, 2005).

Durante os experimentos a fase de escuridão não deve ser interrompida, pois pode causar efeitos adversos ao experimento, em função do estresse causado. A luminosidade nas salas dos animais deve possuir características mais próximas possível da luz natural. A regularidade do fotoperíodo é importante para a manutenção da normalidade comportamental dos animais (sincronização do ciclo circadiano, ciclos reprodutivos, efetividade de drogas, etc). Variações no fotoperíodo (claro/escuro), em função da duração dos dias ou estações do ano, influenciam o comportamento reprodutivo, tempo de duração do parto e podem aumentar a incidência de tumores (Rosenkranz et al., 1978). O controle automático do fotoperíodo nas salas dos animais deve ser estabelecido, pois o controle manual, inevitavelmente, resulta em uma variação na duração dos períodos de claro/escuro, que afetam e propiciam alterações de comportamento (Majerowicz, 2000a). Temos ainda alguns fatores interferentes, tais como a localização das caixas nas estantes e o material usado na confecção das caixas, dentre outros. É um engano achar que a iluminação obtida através das janelas ou vidraças é natural. A luz obtida desta forma apresenta um espectro mais vermelho, para o qual os animais de laboratórios são insensíveis, e menos violeta, que, além de elevar a carga térmica do recinto, aumenta o custo dos equipamentos de climatização (USA, 1971).

A intensidade e a frequência do som, por sua vez, são dois aspectos que também podem afetar os animais (De Luca et al., 1996). Assim, a exposição a sons acima de 85 dB pode causar tanto efeitos auditivos quanto sistêmicos, tais como: eosinopenia, aumento do peso das supra-renais, fertilidade reduzida em roedores e aumento de pressão arterial em primatas não humanos (NRC, 1976). Jain & Baldwin (2003) demonstram que fontes comuns de sons e de atividades relacionadas a biotérios impedem a normalidade fisiológica e comportamental dos animais (Jain & Baldwin, 2003). Animais de laboratório são comumente expostos a ruídos ultra-sônicos (acima de 20 kHz). Ratos e camundongos são sensíveis a frequências acima de 80 kHz e, como exemplo de sons que emitem essa faixa de frequência, estão telefones, rangidos de portas/cadeiras, gotejamento de torneiras e, particularmente, equipamentos de limpeza.

Esses sons podem constituir fator de estresse e induzirem a efeitos adversos, similares aos atribuídos aos sons audíveis (Sales et al., 1998).

De grande importância para um ambiente saudável aos animais são também os insumos rotineiramente utilizados na alimentação, manutenção, conforto e higienização de materiais e ambientes. A aquisição, transporte, armazenamento e manipulação dos alimentos devem ser feitos criteriosamente, de maneira a evitar a introdução de doenças, parasitas, vetores potenciais de doenças e resíduos químicos nas instalações (NRC, 1976). A presença de contaminantes nos alimentos pode causar efeitos perigosos em processos bioquímicos e fisiológicos,

ainda que as concentrações dos agentes de contaminação sejam muito baixas para provocar sintomas de intoxicação (NRC, 1976). Além disso, o bioterista deve estar sempre atento às quantidades de ração e água nas gaiolas, para evitar conflitos e disputas pelos animais.

O material utilizado para as camas dos animais configura outro fator que pode influenciar os dados experimentais e o bem-estar animal (como a maravalha de cedro que desprende hidrocarbonetos aromáticos, os quais têm sido relacionados com o aumento de incidência de câncer) (NRC, 1976). A maravalha é o material mais

animal a alojar, e deve ser preferencialmente de material leve, durável, isolante térmico e de fácil higienização, desinfecção ou esterilização. A madeira deve ser evitada na construção de gaiolas, pois não permite uma higienização eficiente. As dimensões e o acesso do animal à alimentação sólida e líquida devem ser apropriados à espécie e número de animais alojados, de forma a propiciar conforto e bem estar e evitar competição entre indivíduos. As gaiolas utilizadas na experimentação com animais convencionais de laboratório tendem a manter dimensões padronizadas (Tabela 1) (Paiva et al., 2005).

Tabela 1 - Número de animais por caixa para diferentes espécies

Tipo de caixa	Dimensões C x L x A*	Número de animais			
		camundongo	hamster	Rato jovem	Rato adulto
pequena	30 x 20 x 13	5	-	-	-
grande retangular	49 x 34 x 16	20	10	8	4
grande quadrada	41 x 34 x 16	20	10	8	4

*comprimento x largura x altura (cm)

Fonte: Curso de Manipulação de Animais de Laboratório, FIOCRUZ, 2005.

utilizado para forrar as gaiolas, com a finalidade de absorver a umidade proveniente das fezes e urina, bem como favorecer o equilíbrio térmico do animal. Esta deve ser isenta de contaminantes químicos, como os inseticidas e fungicidas usados na proteção da madeira, pois afetam o sistema imunológico dos animais. A esterilização da maravalha é altamente recomendada, pois elimina substâncias químicas e microorganismos, e ainda, reduz o conteúdo de resinas e óleos voláteis. Há outros materiais que podem ser utilizados como cama, tais como palha de arroz, bagaço de cana de açúcar, papel, porém possuem o inconveniente de serem palatáveis e/ou susceptíveis a contaminações (Majerowicz, 2000a). Recentemente no mercado nacional, a "cama" de sabugo de milho tem-se mostrado de grande eficácia, tendo uma grande capacidade absorviva, possibilitando um microambiente seco e confortável aos animais, além de diminuir o número de trocas por semana, conferindo uma economia nos gastos com mão-de-obra, material de higienização e ou desinfecção, e nos casos de biotérios de experimentação, uma diminuição dos riscos biológicos por uma menor circulação de materiais contaminados (Majerowicz, 2000a).

Por se tratarem de ambientes fechados, e de pouca ventilação, os biotérios podem apresentar odores ofensivos não só para os técnicos, mas principalmente, para os próprios animais. Esses odores podem afetar significativamente as respostas fisiológicas e farmacológicas em experimentos. Porém, produtos químicos utilizados para combater esses odores não devem ser empregados, pois podem alterar processos fisiológicos ou metabólicos importantes dos animais, ou até mesmo intoxicá-los. Em lugar do uso destes produtos, devem-se adotar boas práticas de higiene ou o fornecimento de ventilação adequada (NRC, 1976).

A gaiola é outro ponto fundamental para se obter as condições ideais de conforto e bem estar dos animais. O material de construção é variável em função da espécie

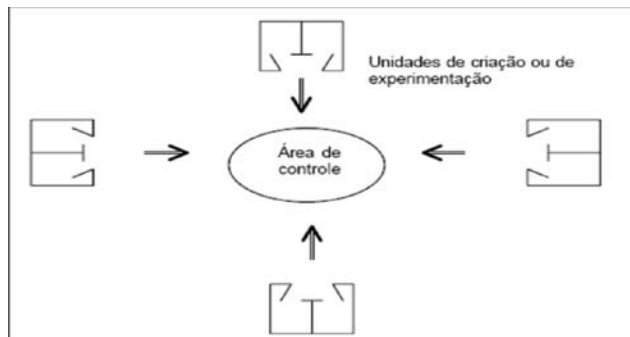
INSTALAÇÃO DE BIOTÉRIOS E BIOSSEGURANÇA

Um dos pontos a ser analisado para a instalação de um biotério é a localização, que está diretamente relacionada à sua finalidade. A localização deverá apresentar certas características, tais como, facilidade de estacionamento, local para carga e descarga de animais e suprimentos (Merusse & Lapichick, 1996).

No biotério de experimentação, onde os animais ficarão alojados durante um determinado período experimental, a prática tem demonstrado a conveniência de que esta construção seja próxima à do laboratório de pesquisa. Ter-se-á, portanto, uma construção em torno da qual existam laboratórios. Assim, deverão ser previstos espaços para a instalação de barreiras sanitárias de proteção, tanto para o trabalhador quanto para o meio ambiente. Preconiza-se a instalação do biotério de criação em áreas isoladas, distantes de centros urbanos, em locais onde possa ser mais facilmente evitada uma introdução de fatores ambientais desfavoráveis, assegurando-se do cumprimento das normas adequadas de transporte dos animais (Cardoso, 2001).

Os biotérios podem ser implantados de duas formas: pavilhonar ou em bloco único (Cardoso, 2001). O sistema pavilhonar possui áreas destinadas aos animais independentes da área de controle de serviços. Nas áreas dos animais encontram-se os equipamentos mecânicos, bem como o depósito de ração e suprimentos. Nas áreas de serviço encontram-se a recepção dos suprimentos, escritórios e equipamentos para lavagem e desinfecção. Esta forma é bastante favorecida por limitar o acesso. Os animais são facilmente separados por espécie e por categoria, em edificações específicas, contendo anexos comuns. Além disto, a construção pavilhonar facilita a expansão quando necessária (Cardoso, 2000).

Porém, para este tipo de edificação, são elevados os custos de construção e de manutenção. Os espaços de apoio comuns deverão estar localizados centralmente em relação às áreas de produção a fim de que sejam facilitados os fluxos operacionais (Figura 2) (Cardoso, 2001).



Fonte: Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa, 64-67, 1998-2001.

Figura 2. Sistema pavilhonar de construção.

O sistema de construção em bloco único está disposto num só piso, situado ao nível térreo, para facilitar o controle sanitário, as rotinas de trabalho, o acesso de pessoal, de suprimentos e a evacuação de lixo. Neste tipo de implantação os acessos ao biotério se dão através de barreiras. São independentes dos acessos às outras áreas ocupadas. Pode possuir um único corredor ou um sistema de dois corredores (Cardoso, 2001). No sistema mais simples, que constitui o biotério convencional, a circulação de pessoas, material limpo, lixo contaminado e de outros materiais, são feitos através de um único corredor, o que pode propiciar contaminação (Figura 3a).

No segundo tipo o acesso e a saída das salas são separados, ou seja, passam a ocorrer por dois corredores independentes, havendo, portanto, maior nível de contenção. Este biotério possui melhor padrão sanitário, porém, requer maior área física. Temos dois corredores separados. O primeiro, denominado corredor de acesso (de distribuição ou corredor “limpo”), é destinado ao tráfego de pessoal técnico e de material a ser enviado às salas. O segundo, denominado corredor de retorno (corredor “contaminado” ou “sujo”) é destinado à saída de todos os materiais a serem encaminhados à esterilização, lavagem e incineração (Figura 3b).

Tanto para a forma pavilhonar quanto para a de bloco único, o biotério deverá ser implantado em áreas dotadas de todos os tipos de serviços públicos necessários ao seu perfeito funcionamento (De Luca et al., 1996).

O manejo de animais oferece aos humanos, basicamente, dois tipos de risco: o de infecção e o traumático (Cardoso, 2001). Os animais podem excretar microrganismos nas fezes, urina, saliva ou aerolizá-los, originando, conseqüentemente, infecções, alergias e outros problemas. Existe ainda a possibilidade de inoculação de patógenos por mordeduras ou arranhaduras, assim como a transmissão direta, por contato com o animal, seu sangue ou tecidos coletados em necrópsias e autópsias, e indireta, por inalação de poeira originada das gaiolas e camas dos animais (Seamer & Wood, 1981). Além disso,

muitos animais apresentam infecções assintomáticas, o que aumentam os riscos de contaminações (Edward, 1969).

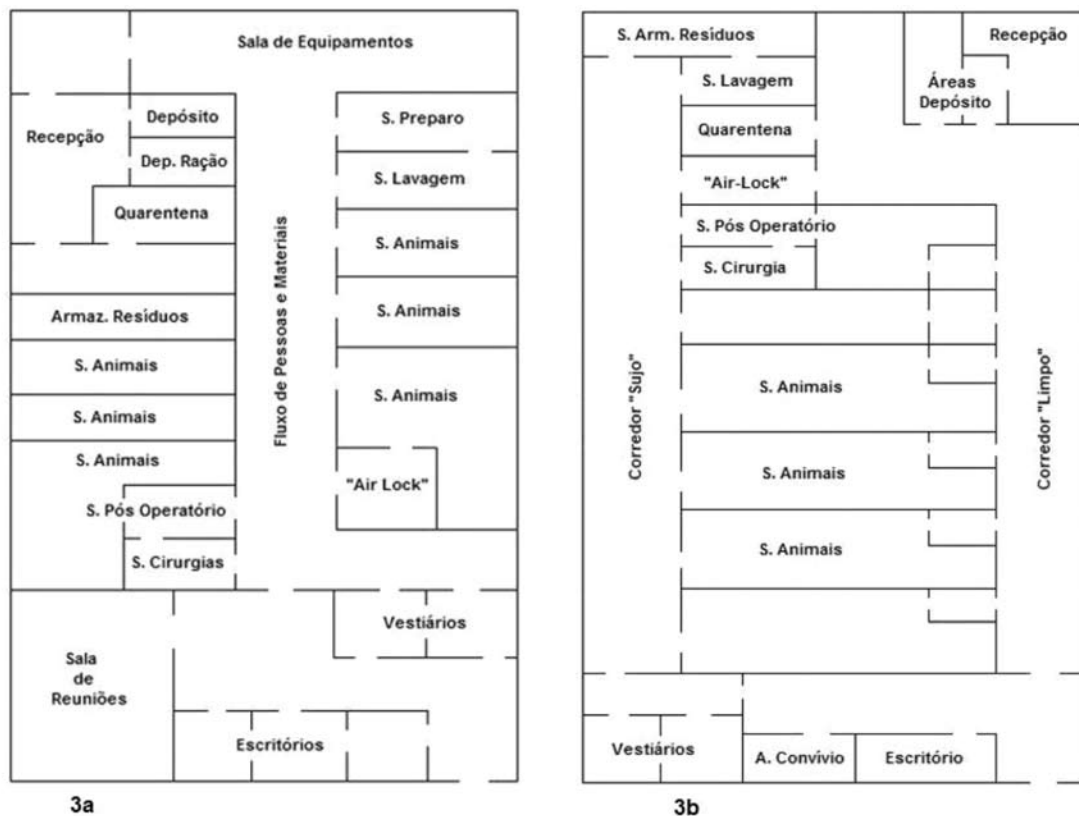
Quanto às medidas específicas de segurança para experimentação animal com agentes perigosos, deve ser dada especial atenção aos procedimentos sobre cuidados e alojamento de animais, armazenamento de agentes de risco e prevenção contra perigos causados por esses agentes, dosagem e administração de medicamentos, manuseio de tecidos e fluidos corporais, eliminação de excretas e carcaças e proteção pessoal. Exige-se o emprego de equipamento de segurança específico, bem como o seu manejo adequado, além de práticas seguras. Em suma, para uma segurança eficaz, é necessário pessoal treinado e que siga rigorosamente a aplicação das normas de proteção contra riscos (NIH, 2002). No Manual de Biossegurança de Laboratório, encontram-se diretrizes para a experimentação animal que sumarizam as recomendações de outros guias e recomendações nacionais e estrangeiras (Seamer & Wood, 1981; CDC, 1993; FIOCRUZ, 1998; Majerowicz, 2000b; Richmond, 2000; Neves & Guinski-Chaguri, 2001; Majerowicz, 2003; WHO, 2003).

A biossegurança é demonstrada mediante a determinação dos níveis de contenção física, de seus requisitos e da utilização de procedimentos de boas práticas laboratoriais, que são objetos da derivação dos julgamentos dos pesquisadores baseados no conhecimento atual e que têm por objetivo o desenvolvimento de um trabalho seguro (CDC, 1979). Os níveis de contenção física são classificados em quatro classes de risco (Simas, 1996). Laboratórios de experimentação animal de nível de biossegurança 1 (NB 1) são aqueles utilizados no ensino básico. Nestes não é necessário nenhum tipo de desenho especial além do atendimento às boas práticas laboratoriais e de um planejamento eficaz, sendo apropriado para a manutenção da maioria dos estoques de animais após a quarentena e para animais inoculados com agentes do grupo de risco 1.

Os laboratórios de experimentação animal de nível de biossegurança 2 (NB 2) são aqueles que manipulam animais infectados com microrganismos da classe de risco 2. Nestes, o atendimento das boas práticas laboratoriais estão somadas a alguns requisitos físicos de construção. Os laboratórios níveis 1 e 2 são considerados laboratórios básicos de experimentação animal.

O laboratório de experimentação animal de contenção, nível de biossegurança 3 (NB 3), requer desenho e construção mais especializados que aqueles de níveis 1 e 2. Neste nível de biossegurança, os técnicos deverão receber treinamentos específicos quanto ao manuseio seguro destes microrganismos.

No laboratório de experimentação animal de contenção máxima, nível de biossegurança 4 (NB 4), as atividades estão diretamente relacionadas às atividades do laboratório de contenção máxima. Só deverão funcionar sob o controle direto das autoridades sanitárias e, devido ao alto grau de complexidade de atividades, recomenda-se elaboração de manual de procedimento de trabalho testado previamente por exercícios de treinamento (Majerowicz, 2005).



Fonte: Adaptado de Bol. Centr. Panam. Febre Aftosa, 64-67, 1998-2001.

Figura 3. Biotério de corredor único (3a) e biotério com dois corredores (3b) (National Research Council)

O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro), define, em sua norma nº NIT-DICLA-028, de setembro de 2003 - “*Crítérios para o credenciamento de laboratórios de ensaios segundo os princípios BPL (Boas Práticas de Laboratório)*”, ou seja, reúne diretrizes para a concretização de um sistema da qualidade que abranja o processo organizacional e as condições em que estudos são planejados, gerenciados, desenvolvidos, monitorados, registrados, arquivados e relatados (INMETRO, 2003). A proposta destes princípios de BPL é, portanto, promover o desenvolvimento da qualidade dos dados de testes e capacitar um instrumento diretivo que assegure a saudável abordagem gerencial, incluindo conduta, informação e arquivamento dos estudos de laboratório (WHO, 2001).

No Brasil, as BPL (recomendadas pela legislação ambiental do IBAMA) aplicam-se, obrigatoriamente, aos laboratórios que trabalham nas áreas de toxicologia, ecotoxicologia e ecossistemas. As diretrizes e os princípios das BPL foram publicados pela primeira vez pelo Inmetro em 1995 (Silva, 2004). Atualmente, são aplicados os critérios contidos na Norma Inmetro Nº NIT-DICLA-028, baseados em documentos originais da OECD (Silva, 2004).

O papel do laboratório no que diz respeito à adoção de um sistema que assegure a consistência requerida ao produto reflete a necessidade de boas práticas de fabricação como parte da garantia da qualidade (Milstien, 2002). Toda Unidade Organizacional (UO) deve ter *Procedimentos Operacionais Padrão* (POP) escritos, revisados, numerados e aprovados, como atestado da qualidade, pela Unidade

da Garantia da Qualidade (UGQ). Garante-se, assim, que as condições técnicas e de gerenciamento dos fatores que influenciam na qualidade dos ensaios que compõem um estudo sejam aderentes aos critérios da BPL (INMETRO, 2003). Uma coleção de bons POPs é um pré-requisito para o sucesso de conformidade de BPL. A composição de um sistema de POPs é, muitas vezes, a mais importante ação e exige consumo de tempo para a conformidade desse trabalho (WHO, 2001). Os princípios das boas práticas, os conceitos da garantia da qualidade, as legislações, as recomendações de biossegurança e manejo de animais de laboratório representam, portanto, uma etapa fundamental para o estabelecimento da qualidade, reprodutibilidade e confiabilidade nos experimentos realizados em quaisquer biotérios.

BIOTERISMO

No Brasil, é recente a preocupação com a qualidade dos biotérios. Mesmo com o elevado nível de formação científica já alcançada no país, a atenção dada aos biotérios é incipiente. Na maioria das vezes, as instalações físicas e os equipamentos de segurança destinados aos animais de laboratório são impróprios e não atendem aos requisitos mínimos de segurança, conforto e higiene. Ao mesmo tempo, o pessoal técnico responsável pelo manejo dos animais não apresenta qualificação e preparo para desenvolver as suas atividades. Desta forma, os animais utilizados nos experimentos não apresentam um padrão

adequado para a finalidade a que se destinam. Esta situação, também se reflete no número e na qualidade de publicações produzidas pelos pesquisadores brasileiros. De fato, as revistas internacionais mais prestigiadas exigem dos autores dos trabalhos com animais a declaração de que seus trabalhos foram efetuados segundo os requisitos dos manuais e legislações publicados pelas autoridades internacionais (Duarte, 2003).

Os primeiros trabalhos em bioterismo, de José Ribeiro do Valle e José Leal Prado, datam da década de 1940 e podem ser considerados como o marco inicial de definição do campo no país. Três décadas depois, em 1978, um trabalho internacional demonstrou a precária situação dos biotérios dos países em desenvolvimento, alcançando grande impacto junto às publicações internacionais (Rosenkranz et al., 1978). Houve grande repercussão na comunidade científica brasileira que passou então a rever, em conjunto com as agências de fomento, os antigos programas existentes para a Ciência de Animais de Laboratório.

Na década de 1980, a necessidade de elaborar um diagnóstico e de introduzir o planejamento nas atividades relacionadas a Biotério no Brasil passaria a ocupar lugar central nas primeiras discussões entre o COBEA, fundado em 1983, a Academia Brasileira de Ciências (ABC) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). Com efeito, as recomendações e o apoio das agências de fomento foram fundamentais para a constituição, na segunda metade daquela década, de centros de referência na produção de modelos animais em pesquisa e desenvolvimento tecnológico, técnicas cirúrgicas e produção de fármacos e imunobiológicos. Esses centros passaram a adotar os parâmetros preconizados e certificados, em matéria de qualidade animal, por entidades internacionais, tais como ICLAS (*International Council for Animal Laboratory Science*), AALAS (*American Association for Laboratory Animal Science*) e FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*).

Os novos padrões difundiram-se para outras instituições que também seriam reconhecidas internacionalmente e diversos especialistas brasileiros receberam treinamento em centros dos Estados Unidos e da Europa. Consolidavam-se assim, no país, os denominados Centros de Bioterismo, com o apoio público decisivo, sobretudo da FINEP, CNPq e FAPESP. No entanto, o declínio progressivo do FNDCT (Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) veio a ter conseqüências negativas sobre essas atividades, assim como para todas as demais, consideradas como partes integrantes da infra-estrutura de pesquisa e desenvolvimento no país. Seguiu-se um longo período de escassez de recursos e descontinuidade nos investimentos.

Somente em 2001, com a criação dos Fundos Setoriais, que o tema voltaria a merecer destaque (CGEE, 2003). Nos meses de dezembro de 2002 a janeiro de 2003, o Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP, atendendo a uma solicitação

do CT-Infra (Fundo de Infra-Estrutura) e do CGEE (Centro de Gestão e Estudos Estratégicos), realizou um levantamento para caracterizar a situação dos biotérios no Brasil. Foram coletados dados referentes a 120 biotérios brasileiros, sendo 62 biotérios de produção e 58 biotérios de experimentação. Assumindo-se como universo de referência os atuais 250 biotérios filiados ao COBEA, esse cadastro, denominado “Cadastro Nacional de Biotérios de Produção e Experimentação”, no momento da análise, abarcava 48% do total. Essas informações cadastrais, ainda que não condizentes com a totalidade dos biotérios brasileiros, representaram uma atualização em relação ao último levantamento semelhante efetuado no país, patrocinado pelo COBEA, realizado em 1996.

Infelizmente, poucos biotérios do país apresentam recursos humanos com formação apropriada e infraestrutura básica de pesquisa, equivalentes àqueles existentes nos Estados Unidos e Europa, que contam com empresas de grande porte tais como “Charles River”, “Taconic”, “Harlan”, “Jackson Laboratory”, “Wistar Institute”, “National Institute of Health”, entre outras.

No geral, os biotérios brasileiros se situam na região Sul e Sudeste. Nas demais regiões, e em particular no Nordeste, as condições existentes para produção e fornecimento de animais de laboratório são incompatíveis com a competência científica instalada na região.

A falta de investimentos importantes em alojamentos, seja de criação ou de experimentação, faz com que a maioria destes locais, classificados como sanitariamente convencionais, permita a contaminação dos animais com agentes do meio externo, dificultando o desenvolvimento das pesquisas nas áreas biomédicas e constituindo uma barreira na produção de medicamentos, vacinas, testes toxicológicos, etc.

Os biotérios dotados de meios apropriados para cumprir tais exigências são caros. Segundo o levantamento do CGEE, executado em 2003, estima-se que o total de investimentos, somente em biotérios de produção, alcance o montante de R\$ 69.697.300,00.

Tendo em vista esses altos custos, a alternativa mais viável para o emprego destes recursos é a implantação de uma rede de biotérios (Duarte, 2003). Um modelo para a implantação da rede de biotérios consiste em um biotério de criação associado a um conjunto de biotérios de experimentação de diferentes instituições.

O investimento em um biotério de criação associado a uma rede de biotérios de experimentação permite produzir animais de qualidade com padrão genético e sanitário definido. A instalação de um biotério central que forneça matrizes para uma rede regional de biotérios permitirá racionalização dos custos, já que evitará duplicação do número de animais reservados para procriação, assim como a padronização da qualidade dos animais utilizados e também dos funcionários, que passam a empregar procedimentos uniformes de manuseio, condições de higiene etc. Essa qualificação do pessoal técnico economizará esforços e custos com treinamento individual (Duarte, 2003).

CONCLUSÃO

Não há dúvidas sobre as vantagens advindas da organização de redes de biotérios como uma forma de se contribuir para acelerar a melhoria da infra-estrutura de biotérios e, portanto contribuir para o fortalecimento das pesquisas na área da saúde e de ciências biológicas. Num país que já alcançou um determinado nível de excelência e reconhecimento internacional no que diz respeito à qualidade das pesquisas científicas, é imperativo e urgente procurarmos alternativas para melhorar as condições de instalação e funcionamento dos biotérios. Como metas principais, devemos buscar a qualificação de profissionais na manipulação dos animais (pesquisadores, veterinários, zootecnistas, técnicos de biotério, assistentes, etc.), com o desenvolvimento de um programa nacional de capacitação de recursos humanos em bioterismo; padronização das normas e procedimentos de manipulação dos animais; obtenção de insumos de preferência dos mesmos fornecedores, garantindo redução de custos e padrão de qualidade, assim como obtenção de novas cepas ou linhagens de animais com certificado de qualidade; implantação das normas de biossegurança; consolidação das comissões de ética, estimulando a obrigatoriedade de aprovação dos protocolos experimentais, procurando minimizar ao máximo a quantidade de animais utilizados nas pesquisas, adotando técnicas alternativas (Duarte, 2003).

Os avanços conquistados nestes últimos anos devem servir de incentivo à busca de novos conhecimentos na descoberta de fármacos, medicamentos e tratamentos para a melhoria da saúde humana e animal.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo auxílio financeiro.

ABSTRACT

Animal housing: characterization, legislation and biosafety standards

The use of laboratory animals in conjunction with research on the human organism provides a basis for on understanding of several important physiological and pathological processes. Besides, the results of experimental studies enable technical and safety improvements to be made in surgical techniques used in the medical clinic. As living biological material is involved, we should guarantee its physical well-being, taking into account microbiological contamination and the genetics, nutrition and correct manipulation of the animals, in order to avoid incorrect conclusions from the experiments or unnecessarily large numbers of animals being used. In parallel with the concerns and legislation

on the use of laboratory animals, there is also a growing preoccupation with the welfare and safety of those who handle the laboratory animals, since they run the risk of acquiring occupational diseases through contact with zoonotic pathogens or developing allergies. Prevention requires the application of modern technological advances in the design of the animal house and in the work routines. Unfortunately, few establishments in Brazil possess staff with adequate training and a basic infrastructure of research that includes the laboratory animal breeding centers, equivalent to those existing ones in the United States and Europe.

Keywords: laboratory animals; legislation; animal house; safety.

REFERÊNCIAS

Afif MO, Rosenkranz A. *Guia para el uso de animales de laboratorio*, parte I. Bogotá: Universidad Nacional de Colômbia; 1990. p.49-56.

Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(2):231-66.

Besch EL. Environmental quality within animal facilities. *Lab Anim Sci* 1980; 30(2):385-406.

CCAC. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and animal use of experimental. Ottawa: 2.ed.; Olfer ED, Cross BM, McWilliam AA. 1993. v.1

Cardoso TAO. Programa arquitetônico de biotérios. In: Teixeira P, org. *Curso de aperfeiçoamento em biossegurança*. Rio de Janeiro: EAD/Ensp; 2000. p.21-42.

Cardoso TAO. Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios. *Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa* 2001; 3-17; 64-7.

CDC, NIH. Center for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 3rd.ed. Washington, 1993 (HHS publication, nº 93-8359).

CDC. Centers for Disease Control. *Laboratory safety*. Atlanta, US: Dep. Health, Education and Welfare/Public Health Service; 1979. (HEW Publication, CDC79-818).

CGEE. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. *Programa de ação para biotérios* – Documento Síntese. São Paulo: Ministério da Ciência e Tecnologia. 2003.

Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2007; 28(1):11-23.

- Clough G. Environmental effects on animals used in biomedical research. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1982; 57(3):487-523.
- CPCSEA. Committee for the Purpose of Control and Supervision on Experiments on Animals. Guidelines for laboratory animal facility. *Indian J Pharmacol* 2003; 35:257-74.
- De Luca RR, Alexandre SR, Marques T, Souza NL, Merusse JLB, Neves SP. *Manual para técnicos em bioterismo.* 2.ed. São Paulo: Winner Graph; 1996.
- Duarte GI. *Programa de ação para biotérios.* São Paulo: Rede Nordeste de Biotérios, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE); 2003.
- Edward AG. Minimizing hazards to man in the laboratory animal facility. *J Am Vet Med Assoc* 1969; 155(12):2158-9.
- FELASA. Federation of European Laboratory Animal Science Associations . FELASA guidance paper for the accreditation of laboratory animal diagnostic laboratories. *Lab Anim* 1999; 33(Suppl. 1):19-38.
- Festing MF. Genetic variation in outbreed rats and mice and its implications for toxicological screening. *J Exp Anim Sci* 1993; 35(5-6):210-20.
- FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Comissão Técnica de Biossegurança (CTBio). *Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ.* Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1998.
- Górska P. Principles in laboratory animal research for experimental purposes. *Med Sci Monit* 2000; 6(1):171-80.
- Hesler JR, Moreland AF. Design and management of animal facilities. In: Fox, JG, Cohen, BJ, Loew, FM, editors. *Laboratory animal medicine.* Orlando: Academic Press; 1984.
- IVIS. International Veterinary Information Service. Quality Assurance/ surveillance monitoring programs for rodent colonies. In: Reuter JD and Suckow MA, editors. *Laboratory Animal Medicine and Management.* New York: IVIS; 2003.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Critérios para o credenciamento de laboratórios de ensaios segundo os princípios BPL – Boas Práticas de Laboratório, Norma nº NIT-DICLA-028.* 2003. Disponível em URL: <http://www.inmetro.gov.br/kits/nitdicla028r01.doc>. [13 abr 2008].
- Jain M, Baldwin AL. Are laboratory animals stressed by their housing environment and are investigators aware that this stress can affect physiological data? *Med Hypotheses* 2003; 60(2):284-9.
- Jonas AM. The research animal and the significance of a health monitoring program. *Lab Anim Sci* 1976; 26(2):339-43.
- Lang CM, Vessel ES. Environmental and genetics factors affecting laboratory animals: impact on biomedical research. Introduction. 59th. Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology. New Jersey. *Fed Proc* 1976; 35:1123-4.
- Majerowicz J. *Procedimentos de biossegurança para as novas instalações do laboratório de experimentação animal (Laean) de Bio-Manguinhos.* [Dissertação] Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz de Tecnologia em Imunobiológicos; 2005.
- Majerowicz J. Biossegurança em biotérios de experimentação. In: Valle S; Telles JL, orgs. *Bioética e biorrisco – Abordagem transdisciplinar.* Rio de Janeiro: Interciência, 2003. p.315-40.
- Majerowicz J. Procedimentos de segurança envolvendo animais de laboratório. In: Teixeira P, org. *Curso de aperfeiçoamento em biossegurança.* Rio de Janeiro: EAD/Ensp; 2000a. p.1-10.
- Majerowicz J. Risco biológico e níveis de proteção. In: Teixeira P, org. *Curso de aperfeiçoamento em biossegurança.* Rio de Janeiro: EAD/Ensp; 2000b. p.11-26.
- Marona HRN; Lucchesi, MBB. Protocol to refine intestinal motility test in mice. *Lab Anim* 2004; (38):257-60.
- Marona HRN. Princípios éticos da experimentação animal. *Rev Ciênc Farm* 2003; 24 (2): 97-106.
- Marona HRN, Lucchesi MBB. Refining the intestinal motility test in mice to reduce animal stress. *Rev Ciênc Farm* 2003; 24(1):79-82.
- Merusse JLB, Lapichick VBV. Instalações e equipamentos. In: Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. *Manual para técnicos em bioterismo.* Brasília, DF: COBEA; 1996.
- Milstien J. Regulatory process and three Rs alternatives. *Dev Biol* (Basel) 2002; 111-59.
- Neves SMP, Guinski-Chaguri LCA. Biossegurança em biotérios. In: Hirata MH; Filho JM, editors. *Manual de Biossegurança.* São Paulo: USP; 2001.

- NIH. National Institute of Health. Environment, housing and animal management. in: Institutional Animal Care and use Committee Book guidebook. 2.ed. Bethesda. 2002. (NIH Publication n°. 92-3415).
- NRC. National Research Council (NRC). *Long-Term Holding of Laboratory Rodents*. Washington: ILAR News; 1976; v. 4.
- Oda L. Biossegurança no Brasil segue padrões científicos internacionais. *Biotechnolog Ciênc Desenvolv* 2001; 3(18):5-8.
- Paiva FP, Maffili VV, Santos ACS. *Curso de manipulação de animais de laboratório*. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.
- Passos LAC. *Análise do determinismo genético da resistência de camundongos infectados experimentalmente com a cepa y de Trypanosoma cruzi*. [Tese] Campinas: Instituto de Biologia. UNICAMP; 2003.
- Rehg JE, Toth LA. Rodent quarantine programs: purpose, principles, and practice. *Lab Anim Sci* 1998; 48(5):438-47.
- Richmond JY. *Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia*. Brasília: ed. Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2000.
- Rosenkranz A, Jurkiewicz A, Corrado A. Situação dos biotérios brasileiros: fator limitante de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos de produtos naturais. *Ciênc Cult* 1978; 32:156-63.
- Sales GD, Wilson KJ, Spencer KEV, Milligan SR. Environmental ultrasound in laboratories and animal houses: a possible cause for concern in the welfare and use of laboratory animals. *Lab Anim* 1998; 22:369-75.
- Schnaider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. *Rev Bras Anestesiol* 2003; 53(2):278-85.
- Seamer JH, Wood M. *Handbooks 5: Safety in the animal house*. London: Laboratory Animals Ltda; 1981.
- Silva ABM. *Proposta para a implantação, implementação e avaliação de um programa de gestão da qualidade nos laboratórios de referência para a vigilância epidemiológica da Fiocruz*. Rio de Janeiro. [Dissertação] Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde pública. Fiocruz; 2004.
- Silva APR, Valentini EJG, Távora, MFCLF, Rodrigues UP, Moreira VB, Mattarala VGM Animais de experimentação: cuidados e descartes. *Biotechnolog Ciênc Desenvolv* 2003; 35:16-20.
- Simas C. Biossegurança e arquitetura. In: Teixeira P, Valle S. *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar*. Rio de Janeiro, RJ: FIOCRUZ; 1996.
- Small JD. Rodent and lagomorph health surveillance – quality assurance. In: Fox JG, Cohen BJ, Loew FM. *Laboratory animal medicine*. Orlando: Academic Press. 1984.
- USA. United States of American. Departments of the Army. Navy publication n° 255. In: *Technical bulletin (TB)*. Washington, D.C.: The Navy and the Air Force; 1971.
- Weihe WH. The effect of light on animals. In: McSheehy T. *The control of the animal house environment*. London: Laboratory Animals Ltd; 1976. p. 63-67 (Laboratory animal handbooks, 7).
- WHO. World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*. 2.ed. Geneva. 2003. Disponível em URL: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/who_cds_csr_lyo_20034/en/ [13 abr 2008]
- WHO. World Health Organization. *Good Laboratory Practice Handbook*. Geneva. 2001. Disponível em URL: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/glp-handbook.html> [14 abr 2008]