

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ICTB
MPCAL



ICTB
Instituto de Ciência e
Tecnologia em Biomodelos

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

ANA KARINA DOS SANTOS FURTADO

A IMPORTÂNCIA DO BEM-ESTAR EM ANIMAIS DE
LABORATÓRIO E SUA INFLUÊNCIA NOS RESULTADOS DE
ENSAIOS CIENTÍFICOS

Rio de Janeiro
2020



ANA KARINA DOS SANTOS FURTADO

**A IMPORTÂNCIA DO BEM-ESTAR EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO E SUA
INFLUÊNCIA NOS RESULTADOS DE ENSAIOS CIENTÍFICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – Fiocruz/RJ, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciência em Animais de Laboratório.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Melo de Oliveira

Rio de Janeiro
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

dos Santos Furtado, Ana Karina.

A IMPORTÂNCIA DO BEM-ESTAR EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO E SUA INFLUÊNCIA NOS RESULTADOS DE ENSAIOS CIENTÍFICOS / Ana Karina dos Santos Furtado. - Rio de Janeiro, 2020.

84 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2020.

Orientador: Gabriel Melo de Oliveira.

Bibliografia: f. 70-79

1. Animais de laboratório. 2. Camundongos. 3. Bem-Estar Animal. 4. Revisão Bibliográfica. 5. Reprodutibilidade e pesquisa. I. Título.

ANA KARINA DOS SANTOS FURTADO

**A IMPORTÂNCIA DO BEM-ESTAR EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO E SUA
INFLUÊNCIA NOS RESULTADOS DE ENSAIOS CIENTÍFICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – Fiocruz/RJ, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciência em Animais de Laboratório.

Aprovada em ____ de _____ de 20 ____

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina Ribeiro Andrade (ICTB/FIOCRUZ)
(Presidente da Banca)

Prof. Dr. Francisco Odencio Rodrigues de Oliveira (Universidade Estácio de Sá)

Prof^a. Dr^a. Ana Lia Mazzeti (IOC/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a Maria Inês Doria Rossi (ICTB/FIOCRUZ)
(Suplente Interno)

Prof^a. Dr^a Denise da Gama Jaen Batista (IOC/FIOCRUZ)
(Suplente Externo)

Rio de Janeiro
2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que, em sua infinita misericórdia, convergiu todos os caminhos que me trouxeram até aqui;

À orientação do Prof. Dr. Gabriel Melo de Oliveira que tanto dividiu comigo seus conhecimentos sobre os animais de laboratório;

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos que, com excelência, oferta cursos no campo dos animais usados para pesquisa, cursos estes que foram minha porta de entrada no Programa de Pós-graduação em Ciências em Animais de Laboratório;

À turma MPCAL 03 formada por pessoas maravilhosamente diversas, irreverentes e companheiras, pessoas que vou levar com carinho na lembrança;

Aos professores, cada um com seu jeito e dedicação ao ensino;

Aos profissionais de saúde mental que me acompanharam e ainda acompanham;

Às pessoas que me cercam no âmbito familiar e pelem o cotidiano ao meu lado;

Aos animais de laboratório presto minha reverência por tudo o que tornam possível a Ciência.

RESUMO

O bem-estar no uso de animais para fins didáticos e científicos é um tópico em constante discussão. O Conselho para Controle da Experimentação Animal (CONCEA), é a instância a qual possui a responsabilidade de, através de normas e resoluções, viabilizar o uso de animais de laboratório em ensaios didáticos ou biomédicos de forma ética e minimizar o desconforto e o estresse dos animais elevando o Bem-EstarAnimal (BEA) em biotérios. Os objetivos principais dessa dissertação foram: a) realizar um minucioso e detalhado levantamento biométrico e bibliográfico sobre o estudo da preservação do BEA; b) demonstrar que o comprometimento do BEA pode interferir diretamente nos resultados utilizando animais, conseqüentemente, comprometendo o princípio ético dos 3Rs e c) propor novas abordagens e material teórico e prático que possam servir como referência na preservação do BEA durante os ensaios biomédicos. Os resultados demonstraram que a pesquisa em relação ao BEA, de forma global, é muito reduzida quando comparada ao uso do próprio modelo animal. A regulamentação do CONCEA oferece uma série de formas para elevação do BEA. Seguindo as respectivas normatizações e regulamentações e associado com o levantamento bibliográfico e testes preliminares de preferência dos animais em diferentes tópicos sugeridos nas Resoluções Normativas, concluiu-se que para que o BEA seja preservado, é necessária a avaliação dos seguintes quesitos: i) a preferência dos animais ao produto/material oferecido; ii) capacidade de adaptação do animal e iii) manutenção da rotina e dos procedimentos realizados com os animais, evitando mudanças abruptas. Dessa forma, é sugere-se que a influência nos resultados dos ensaios científicos que utilizam animais será minimizada e conseqüentemente sua confiabilidade e reprodutibilidade elevadas.

Palavras-chave: Animais de laboratório, Camundongos, Bem-Estar Animal, Revisão Bibliográfica, Reprodutibilidade e pesquisa.

ABSTRACT

Animal welfare and experimental use is a topic in permanent discussion. The Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) was created, which has the responsibility, through rules and resolutions, to enable the use of laboratory animals in didactic or biomedical tests and minimize animal stress and discomfort of the laboratory animals, raising Animal Welfare (AW). The primary purpose of this dissertation were: a) conduct a thorough and detailed biometric and bibliographic survey on the study of the preservation of the AW; b) demonstrate that the impairment of AW can directly interfere with results using animals, thereby compromising the 3Rs Ethical Principle; and c) propose new approaches and didactic materials that can serve as a reference in the preservation of AW during biomedical trials. The results show that research on AW globally is very small compared to the use of the animal model itself. CONCEA regulations offer a number of ways to increase the BEA. Following the respective norms and regulations and associated with our bibliographic survey and preliminary animal preference tests on different topics suggested in the Normative Resolutions, concluded that for the preservation of AW, it is necessary to evaluating the following items: i) preference from animals to the product/material offered; ii) adaptability of the animal and iii) maintenance of routine and procedures performed with animals, avoiding abrupt changes. Thus, suggestion is that the influence on scientific trials results will be minimized and consequently the reliability and reproducibility of the trials using animals being increased.

Keywords: Laboratory Animals, Mice, Animal Welfare, Bibliographic Reviews, reproducibility and research.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Conceito e definição de bem-estar para animais de laboratório.....	12
2.2. Histórico Geral	13
2.3. Princípios Éticos e a Legislação Brasileira de proteção aos animais de laboratório. 15	
2.3.1. Camundongos.....	17
2.4. Comprometimento do bem-estar de camundongos em laboratório.....	20
2.4.1. Principais causas do comprometimento do BEA em camundongos	22
2.5. A relação entre o desconforto e o estresse de camundongos e os resultados obtidos nos ensaios científicos	24
2.6. Bem-estar animal e a Ciência de Animais de Laboratório.....	26
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS.....	30
4.1. Objetivo geral	30
4.2. Objetivos específicos	31
5. METODOLOGIA.....	31
5.1. Revisão Teórica	31
5.2. Análise de Descritores e Levantamento Bibliográfico	33
5.3. VIDEO ABSTRACT	39
6. ESTADO DA ARTE.....	39
7. RESULTADOS	39
7.1. Análise de Descritores	40
7.2. Levantamento Bibliográfico.....	47
7.2.1. Intersecção na relação BEA & Comprometimento dos resultados científicos... 51	
7.2.2. Avaliação e uso de testes para minimizar o comprometimento do BEA em conformidade com as sugestões das RNs do CONCEA	54
7.2.3. Piso/Cama	55
7.2.4. Alimentação.....	56
7.2.5. Enriquecimento ambiental	59

7.3. VIDEO ABSTRACT	62
8. DISCUSSÃO	63
9. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	70
ANEXO	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Descrição das <i>Esferas do BEA</i> , adaptado de Fraser 2008.....	21
Figura 2: Teoria do Círculo Virtuoso entre <i>BEA & Qualidade Científica</i>	27
Figura 3: Metodologia de busca no DeCS.....	31
Figura 4: Exemplo do levantamento de dados no sítio <i>Pub Med</i>	34
Figura 5: Organograma demonstrativo do esquema de associações das palavras-chave utilizadas na análise de Descritores e no levantamento bibliográfico.....	36
Figura 6: Análise de Descritores entre os descritores <i>Bem Estar e Welfare</i>	38
Figura 7: Análise de Descritores entre os descritores <i>Animais de Laboratório e Bem-estar</i>	39
Figura 8: Análise de Descritores entre os descritores <i>Laboratory Animal e Welfare</i>	40
Figura 9: Análise de Descritores entre os descritores <i>Camundongo e Bem-estar</i>	41
Figura 10: Análise de Descritores entre os descritores <i>Mouse e Welfare</i>	42
Figura 11: Uso do SGI para determinar a preferência dos camundongos ao Piso/Cama.....	56
Figura 12: Comparação do consumo de água entre os diferentes tipos de processamento...	57
Figura 13: Comparação entre dois tipos de ração e diferentes processamentos.....	58
Figura 14: Teste comparativo entre o consumo de ração peletizada e extrusada.....	59
Figura 15: Sistema de resposta a fatores estressores do camundongo.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura da análise de Descritores e do levantamento bibliográfico através da correlação das palavras-chave escolhidas através do DeSC.....	33
Tabela 2: Análise de Descritores das palavras-chave relacionando o BEA e a modulação do estresse.....	43
Tabela 3: Análise de Descritores e levantamento bibliográfico final dos manuscritos.....	44
Tabela 4: Resumo do levantamento bibliográfico relacionando os fatores estressores, o comprometimento do BEA e a interferência nos resultados dos ensaios biomédicos.....	52
Tabela 5: Sugestões da aplicação de insumos e materiais conforme a RN N° 33 do CONCEA e a preferência dos camundongos.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ANGM	Animais geneticamente modificados
BEA	Bem Estar de Animais de Laboratório
CAL	Ciência de Animais de Laboratório
CEUA	Comissões de Ética para o Uso de Animais
CIUCA	Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais
CO ₂	Dióxido de Carbono
COBEA	Colégio Brasileiro em Ciência de Animais de Laboratório
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
DA	Dopamina
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica
DeCS	Descritores em Ciências da Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPA	Diidroxifenilalanina
EP	Epinefrina
EUA	Estados Unidos da América
FP	Flocos de <i>Pinus</i>
IL-1B e 6	Interleucinas 1B e 6
LC-NA	<i>locus coeruleus-noradrenaline</i>
LILACS/BIREME	Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde
LPS	Lipopolissacarídeo
NA	Noradrenalina
NE	Norepinefrina
<i>PubMed</i>	<i>National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine</i>
RN	Resoluções Normativas
SBCAL/COBEA	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SciELO	<i>SciELO - Scientific Electronic Library Online</i>
Sdv	Semanas de vida
SGI	Sistemas de Gaiolas Interligadas
SW-M	Swiss Webster - Machos
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TNF	Fator de Necrose Tumoral
β2Adr	Receptor beta2 adrenérgico

1. INTRODUÇÃO

O uso de animais para fins científicos e didáticos é uma importante atividade no desenvolvimento científico e tecnológico no Brasil, atualmente regulamentada e eticamente praticada. Os pesquisadores responsáveis pelos projetos, na impossibilidade da substituição dos animais, buscam controlar diversas características do ambiente e dos procedimentos de manutenção e manipulação de animais de laboratório. Essas práticas apresentam grande influência no chamado *Bem-Estar de Animais de Laboratório* (BEA) e que irão, como apresentado nessa dissertação, influenciar na confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos durante a execução dos ensaios biomédicos (PAIVA, MAFFILI, SANTOS, 2005; DEGUCHI, TAMIOSO, MOLENTO, 2015). Então, nossa pergunta principal foi: De que maneira (s) o comprometimento do BEA pode interferir nos resultados dos ensaios utilizando animais para fins científicos?

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Conceito e definição de bem-estar para animais de laboratório

O conceito de BEA pode ser definido como o estado obtido quando o animal consegue controlar as variações internas e externas, conseqüentemente, mantendo-se em homeostase ou em harmonia (equilíbrio entre o indivíduo e o ambiente). Contudo, para atingir a homeostase, o animal tenta se adaptar a situações adversas e a controlá-las, assim suas respostas fisiológicas e comportamentais são alteradas, exigindo maior energia metabólica do seu organismo (RIVERA, 2017).

Também conforme descrito por Rivera em 2017, há diversas definições para o BEA. Dentre os autores que definiram o BEA, destacam-se duas teorias: a) BEA absoluto, descrito por Hughes (1981 apud BROOM, 2011) como sendo o estado do organismo em que há harmonia física e mental e b) BEA relativo, descreve como é o estado de um dado organismo durante as suas tentativas de se ajustar com seu ambiente, conforme descrito por Broom em 1996. A avaliação científica do BEA é um elemento-chave nos esforços para implementar boas práticas no uso de animais para fins didáticos e científicos. Envolve múltiplos critérios e é melhor empregada em sistemas que visam identificar as causas de problemas que comprometem o BEA, como por exemplo, identificar oportunidades para a intervenção bem-sucedida em todo o manejo, procedimentos experimentais ou na rotina de uso de animais de

laboratório. A análise do BEA deve ser feita com a participação efetiva de todos os colaboradores envolvidos, em um processo em que se tenta também compreender as percepções e experiências práticas dos manipuladores, bem como, os ativos sociais e materiais que estes possam trazer para a solução de algum tipo de problema (BROOM, 1996; FRASER et al., 2008; APPLEBY et al., 2011; BROOM, 2011).

Segundo Appleby et al. (2011), os principais fatores que devem ser considerados para a manutenção do BEA são:

- Conhecimento do comportamento intrínseco a espécie do animal utilizado e suas especificidades biológicas;
- Proporcionar manejo e condições ambientais adequadas a cada espécie;
- Evitar situação de desconforto, estresse ou dor durante a manipulação ou experimentação do animal.

2.2. Histórico Geral

O uso de modelos animais em pesquisas vem sendo feito desde a antiguidade. Neste período, filósofos e pensadores gregos como Hipócrates (450 a.C.) já relacionavam o aspecto de órgãos humanos doentes com o de animais, com finalidade claramente didática. Os anatomistas Alcmaeon (500 a.C.), Herophilus (330-250 a.C.) e Erasistratus (305-240 a.C.) realizavam vivisseções com o objetivo de observar estruturas e formular hipóteses sobre o funcionamento associado aos órgãos humanos. Posteriormente, Galeno (129-210 d.C.), em Roma, foi talvez o primeiro a realizar cirurgias em animais vivos com objetivos experimentais, ou seja, de investigar a relação entre as alterações observadas nos animais e sua similaridade com o ser humano (SANTACROCE et al., 2017).

A primeira pesquisa científica que utilizou animais sistematicamente, provavelmente tenha sido a realizada por William Harvey, publicada em 1638, sob o título "Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus". Neste livro o autor apresentou os resultados obtidos em estudos experimentais sobre a fisiologia da circulação realizados em mais de 80 diferentes espécies animais (REBOLLO, 2002; ANDROUTSOS et al., 2012).

Em 1641 na Colônia de Massachussets Bay (Estados Unidos), foi documentada, aquela que parece ter sido, a primeira lei considerada de proteção aos animais domésticos. Esta lei propunha que: "...ninguém pode exercer tirania ou crueldade para com qualquer

criatura animal que habitualmente é utilizada para auxiliar nas tarefas do homem”... Em 1822, foi instituída a Lei Inglesa Anticrueldade (British Anticruelty Act) que era aplicável apenas para animais domésticos de grande porte (GOLDIM & RAYMUNDO, 1997; GUIMARÃES ET AL., 2016).

Um importante episódio para o estabelecimento de limites à utilização de animais em experimentação e ensino foi o que envolveu a esposa e a filha do cientista francês Claude Bernard. O grande fisiologista utilizou, por volta de 1860, o cachorro de estimação da sua filha para dar aula aos seus alunos. Em resposta a este ato, a sua esposa fundou a primeira associação para a defesa dos animais de laboratório. A partir desse fato, Claude Bernard deixou inúmeros textos, de excelente qualidade, sobre a ética para com os pacientes e também descrevia que a postura do cientista não poderia ser indiferente ao sofrimento dos animais de laboratório (PAI-DHUNGAT & PARIKH, 2015).

Já a primeira lei a regulamentar o uso de animais em pesquisa foi proposta no Reino Unido, em 1876, através do British Cruelty to Animal Act. No século XIX também surgiram as primeiras sociedades protetoras dos animais. A primeira foi criada na Inglaterra, em 1824 com o nome de Society for the Preservation of Cruelty to Animals, que em 1840 foi assumida pela Rainha Vitória, recebendo a denominação de Real Sociedade. Em 1845 foi criada na França a Sociedade para a Proteção dos Animais. Em anos posteriores foram fundadas sociedades na Alemanha, Bélgica, Áustria, Holanda e Estados Unidos (GOLDIM & RAYMUNDO, 1997).

A primeira publicação sobre aspectos éticos da utilização de animais em experimentação foi proposta nos Estados Unidos pela Associação Médica Americana em 1909. Durante muitos anos as pesquisas, que se utilizaram de modelos animais, não foram fortemente questionadas quanto à ética de seus métodos no usos desses animais devido a sua alta contribuição social, tais como as que possibilitaram o desenvolvimento das vacinas antirrábicas, proteção contra o tétano e a difteria. Em 1959, o zoologista William M.S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch publicaram um livro, onde estabeleceram o Princípio Ético dos três “Rs” para pesquisa em animais: Replace, Reduce e Refine. Esta proposta não impede a utilização de modelos animais em experimentação, mas faz uma adequação para que estes sejam usados de forma consciente. (BALLS et al., 1995, BRAGA, 2017).

Por outro lado, neste mesmo período surgiram inúmeras sociedades de proteção aos animais de caráter contrário ao uso de animais, seja de qual forma requerida pelo homem (GOLDIM & RAYMUNDO, 1997). O livro "Animal Liberation" de Peter Singer, publicado

em 1975, foi de importante influência formativa no movimento homônimo de defesa dos animais, que argumentava contra o "especismo", ou seja, a discriminação de certos seres vivos baseada apenas no fato de estes pertencerem a uma dada espécie. Esta obra causou uma polêmica mundial, principalmente os relatos das condições que os animais eram submetidos pela indústria de cosméticos e no processo de produção de alimentos. Para o pesquisador, todos os seres vivos que são capazes de sofrer devem ter seus interesses considerados de forma igualitária (SUNDSTRÖM, 1995; GOLDIM, RAYMUNDO, 1997).

2.3. Princípios Éticos e a Legislação Brasileira de proteção aos animais de laboratório

No Brasil, a primeira norma legal a fazer referência ao uso de animais com interesse para a ciência foi o Decreto no 24.645 de 1934 (BRASIL, 1934), que determinava a tutela pelo estado de todos os animais existentes no país e definia como condutas de maus-tratos os atos de crueldade, violência e trabalhos excessivos, a manutenção do animal em condições anti-higiênicas e o abandono (GUIMARÃES et al., 2016; REZENDE et al., 2008). Em 1941, grande avanço foi dado com o Decreto-Lei no 3.688, Lei das Contravenções Penais (BRASIL, 1941), que previa pena para a prática da crueldade animal, independentemente da finalidade didática ou científica (CARDOSO, 2009; GUIMARÃES et al., 2016). Posteriormente outras legislações foram aprovadas, como a Lei no 5.197 de 1967, Lei de Proteção à Fauna (BRASIL, 1967a), e o Decreto-Lei no 221/1967, Código de Pesca, (BRASIL, 1967b), mas nenhuma tratou especificamente do tema “Experimentação animal com finalidade didática ou científica” (GUIMARÃES et al., 2016).

No ano de 1979, pela Lei no 6.638, Lei da Vivisseção, (BRASIL, 1979), foram estabelecidas as Normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais, entretanto esta nunca foi regulamentada (CARDOSO, 2009). Dez anos após, a Constituição Federal de 1988, pelo artigo 225, incumbe à coletividade e ao Poder Público proteger a fauna e a flora, vedando práticas que coloquem em risco sua função ecológica, provoquem a extinção de espécies ou submetam os animais à crueldade (BRASIL, 1988; BINSFELD, 2017). Em 1991, procurando orientar a conduta dos profissionais envolvidos com a utilização de animais em pesquisa, o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), criado em 1983, atualmente denominada de Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), instituiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal,

postulando 12 Artigos de uso ético e preservação do bem-estar de animais utilizados em biotérios (REZENDE et al., 2008; CARDOSO, 2009).

Atualmente em vigor, a Lei no 9.605 de 1998, Lei de Crimes Ambientais (BRASIL, 1998), regulamentada pelo Decreto no 3.179 de 1999 (BRASIL, 1999), em seu Artigo 32, estabelece que é crime praticar atos abusivos, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos ou para quem realiza experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos (BINSFELD, 2017).

Porém o marco na ciência em animais de laboratório (CAL) foi alcançado, após 12 anos tramitando no Congresso Nacional, pela aprovação da Lei Arouca, no 11.794 de 08 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008; CONCEA, 2016), regulamentada pelo Decreto no 6.899 de 2009 (BRASIL, 2009). Através dessa lei foi estruturado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), normatizada a constituição de Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) e criado o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA); condições indispensáveis para o credenciamento das instituições com atividades de ensino ou pesquisa com animais de laboratório.

Entraram em vigor em 29 de setembro de 2015 a Resolução Normativa (RN) no 25 que descreve o capítulo "Introdução Geral" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (BRASIL, 2015; CONCEA, 2016) e a RN no 30, de 02 de fevereiro de 2016, que determina a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), na qual apresenta os princípios e as condutas que permitem garantir o cuidado e o manejo eticamente correto de animais produzidos, mantidos ou utilizados em atividades de ensino ou de pesquisa científica no Brasil (BRASIL, 2016a; CONCEA, 2016). Em relação a este trabalho, é importante ressaltar a entrada em vigor da RN no 33, de 18 de novembro de 2016, que propõe o capítulo "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, no qual descreve e orienta sobre estratégias de bem-estar de animais em biotérios, tais como cuidados a serem considerados para o bem-estar de roedores, como camundongos, e lagomorfos (BRASIL, 2016b).

2.3.1. Camundongos

O camundongo é uma das espécies mais utilizada para fins didáticos e científicos. A origem do camundongo ocorreu há 14 milhões de anos por roedores que habitavam a região entre Índia e Paquistão e geravam o gênero *Mus*, o subgênero *Mus*, a espécie *Mus musculus* e várias subespécies. Essa especiação provavelmente estava relacionada à sua migração, colonização e relacionamento comensal com seres humanos. Deste modo, uma característica que se destaca no camundongo é sua capacidade adaptativa e flexibilidade social, buscando sempre o sucesso reprodutivo por meio da provisão de alimentos, territorialismo e formação de pequenos grupos, geralmente polígamos. Ainda assim, pode-se dizer que o camundongo manteve em suas características genéticas seu comportamento selvagem, como competição e agressividade interpessoal, bem como estreita relação com os seres humanos e sua alta adaptabilidade a novos ambientes, principalmente quando relacionado a facilidade de fornecimento de alimentos (DA COSTA et al., 2019).

A origem deste animal como modelo experimental deve-se à captura de subespécies selvagens, principalmente das seguintes: *Mus musculus domesticus*, *Mus musculus musculus*, *Mus musculus castaneus* e a subespécie híbrida *Mus musculus molosinus*. Durante séculos, diversos criadores em diversas localizações geográficas criaram e trocaram indivíduos selecionados dentre eles, o que promoveu uma variabilidade genética muito grande e uma grande dificuldade em registrar com precisão subespécies que deram origem a linhagens isogênicas, mas principalmente não isogênicas. O casal Abbie Lathrop e Leo Loeb em Massachusetts (EUA) são os mais citados nesta atividade. Atualmente, alguns autores relevam a teoria da existência da subespécie *Mus musculus laboratorius* em biotérios. Ao longo dos anos sofrendo pressões evolutivas e seletivas artificiais, a extrema adaptabilidade desse animal (que possibilitou a captura na natureza e a reprodução em cativeiro) e a restrição de espaço no ambiente do laboratório, possivelmente proporcionou, em mais uma variação na subespécie atualmente utilizada em nossos ensaios científicos (EVANGELISTA et al., 2019).

Recentemente, através de diversos estudos por consórcios internacionais do genoma do camundongo pode-se afirmar que haja uma homologia do DNA codificador entre camundongos e o homem entre 70 a 90%. Além disso, passou a ser criado por exibir vários fenótipos interessantes, como o albinismo e mutações espontâneas semelhantes ao ser humano. (ANDRADE et al., 2002; CHORILLI et al., 2007; LAPCHIK et al., 2017).

Conforme descrito por Acevedo-Aroneya et al. (2008 apud FURTADO & OLIVEIRA, 2018), os modelos animais, por mais úteis que sejam, possuem limites para sua utilização e translação de conhecimento para o ser humano. Entretanto, os camundongos são indispensáveis no estudo das doenças genéticas humanas, pois permitem, por exemplo, o estudo de uma síndrome ao longo do tempo, no desenvolvimento de terapias gênicas, na descoberta de novos genes que podem ser uma fonte para novos medicamentos, e/ou genes modificadores, que têm papéis determinantes na gravidade de um fenótipo e que constituem novos alvos para novos tratamentos (MELO et al., 2012; FURTADO & OLIVEIRA, 2018).

Assim como sua diversidade genética, o comportamento de camundongos em biotério, é altamente complexo. Em Swiss Webster *Outbred stock*, machos (SW-M), os resultados da pesquisa demonstraram que o comportamento individual foi diferente em relação a cada faixa etária. Em infantes (4ª semana de vida - sdv) a atividade de maior incidência é o repouso, juntamente com o contato físico. Considerando sua faixa etária como Jovem (6ª sdv), os animais são ativos e curiosos, apresentando maior atividade pela exploração do ambiente e a busca por alimentos. Também é nessa idade na qual o uso de medidas que promovam a expressão de comportamentos naturais da espécie e efeito positivo no BEA, medidas estas conhecidas como enriquecimento ambiental relacionadas a categorias Abrigo (*Igloo*®), nidificação (Papel absorvente) e atividade lúdica (Trapézio) são mais utilizadas. Observa-se nessa idade a incidência de atitudes estereotipadas como atitudes incessantes (compulsivas) de subordinação (física ou sexual) os outros indivíduos do grupo, através de atividade física, como por exemplo, “pular na grade” e outros. Essas atitudes sugerem estar relacionados à elevação entre a 4ª e a 6ª sdv de aproximadamente 75% da concentração plasmática de hormônios sexuais, como a progesterona e a testosterona. Na idade adulta (a partir da 8ª sdv) sua atividade torna-se proporcionalmente mais reduzida ao passar do tempo e sua preferência pelo enriquecimento ambiental torna-se maior pela categoria de Abrigo (*Igloo*®) (CHUMBINHO et al., 2012).

Uma característica muito importante para esses animais são os sentidos de olfato e tato. O bulbo olfatório dos camundongos é proporcionalmente grande quando comparados com o cérebro. Sugere-se que a percepção de cheiro, principalmente de feromônios, estão ligadas a quase todas as atividades desse animal, desde o reconhecimento entre os indivíduos, comunicação e percepção da área e reprodução. Além disso, a atividade de *Sniffing* (cheirar o focinho ou a região urogenital entre os indivíduos) é muito importante na estrutura do grupo, pois lutas e brigas sempre são mediadas através do *Sniffing*. O tato também é muito

importante, não somente na condição de percepção espacial através das vibrissas, mas também pela necessidade de formar grupos, promovendo o contato físico entre os indivíduos e possibilitando uma situação de conforto e proteção (CAMPOS et al., 2016; FURTADO & OLIVEIRA, 2018).

Os camundongos são animais altamente territorialistas (mesmo em restrição de espaço). Através dos resultados obtidos durante utilizando o Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI), aventou-se que a dominância ao território deva ocorrer devido à busca por uma maior área/indivíduo para acasalamento (MARTINS et al., 2017).

Um importante tópico acerca de camundongos é a agressividade entre machos adultos, principalmente em SW-M. Foi observado que estes animais são altamente susceptíveis ao estresse, havendo uma grande variação individual entre a resiliência e a susceptibilidade aos fatores estressores. Alguns grupos de camundongos adultos podem ser reagrupados e conviver harmonicamente, porém na maioria das gaiolas há presença de um indivíduo dominante, que pode apresentar agressividade exacerbada e realizar vários episódios agressivos nos camundongos subordinados. Há, ainda, dentro da escala hierárquica de um grupo de camundongos, a categoria de camundongos neutros, que são indivíduos que não agredem nem são agredidos pelo dominante (sendo por volta de 25% da população) (DANTAS et al., 2008; KUZEL et al., 2013; OLIVEIRA, et al., 2014). A agressividade entre os indivíduos, geralmente é manejada através do isolamento social em machos adultos. Sendo que o isolamento social pode comprometer gravemente o BEA, pois apesar das brigas promoverem lesões e ferimentos, os animais ainda preferem manter-se em grupos do que isolados (DE OLIVEIRA & BRITO, 2019).

Uma forma de manejo para evitar a agressividade em camundongos machos adultos é o agrupamento desses animais após o desmame (até a 4ª sdv) e mantendo os mesmos grupos durante a toda manutenção no biotério. Acredita-se que eles são capazes de formar um agrupamento fraternal, mesmos que não sejam irmãos, diminuindo significativamente a incidência de agressividade na idade adulta e não sendo necessário o uso do isolamento social (KUZEL et al., 2013).

Então, é admissível concluir que na presença de estresse, ou comprometimento do BEA, de intensidade baixa ou alta, sendo o indivíduo susceptível ao fator estressor e não conseguindo se adaptar adequadamente à situação de estresse (como o estresse social do reagrupamento na idade adulta), o seu nível médio de corticosterona sérico é curiosamente inferior, inclusive quando comparado com os indivíduos subordinados e agredidos. A relação

entre a testosterona e a progesterona torna-se menor, gerando diminuição da capacidade de maturação dos espermatozoides e fertilidade, enquanto o nível de dopamina é aproximadamente 80% maior nos camundongos altamente agressivos quando comparados com os animais reagrupados com convívio harmônico (FURTADO & OLIVEIRA, 2018).

O comprometimento do BEA também influencia o sistema de respiração celular que ocorre através da cadeia energética mitocondrial dos neurônios do córtex cerebral ficando este comprometido pela disfunção da enzima citocromo *c* oxidase. Somente o tratamento com antipsicóticos de 2ª geração como o haloperidol e a risperidona foram capazes de diminuir a agressividade exacerbada dos respectivos indivíduos (BATISTA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015, FURTADO & OLIVEIRA, 2018).

Pelo conjunto dessas informações, é possível observar que o camundongo, como componente da base da cadeia alimentar, com seu metabolismo altamente acelerado, por volta de 600 batimentos cardíacos por minuto, é fisiologicamente preparado para luta ou fuga, conseqüentemente, pode-se sugerir que naturalmente são relativamente susceptíveis ao estresse. Porém alguns indivíduos são capazes de se adaptar com maior estabilidade a fatores estressores (resilientes) em ambiente de restrição (neste caso os biotérios, principalmente os de experimentação). Os indivíduos susceptíveis que conseqüentemente não conseguem se adaptar a fatores estressores apresentam alterações neuroendócrinas que podem se manifestar, como por exemplo, em nosso modelo experimental, por comportamentos alterados (estereotipados). Cabe ressaltar que, além das alterações neurológicas, o sistema fisiológico, o imunológico e o endocrinológico também estarão afetados e esse conjunto de fatores poderão comprometer diretamente os resultados dos ensaios biológicos (SCHANAIDER & SILVA, 2004, OLIVEIRA et al., 2015).

2.4. Comprometimento do bem-estar de camundongos em laboratório

O comprometimento do BEA, como os camundongos mantidos em biotérios, está ligado majoritariamente aos fatores: i) humano, usuários de animais de laboratório; ii) ambiental, relacionado ao alojamento e manutenção dos animais e iii) intrínseco ao animal, relativo ao comportamento e à biologia de cada espécie (APPLEBY et al., 2011, FURTADO & OLIVEIRA, 2018).

A habilidade e a sensibilidade dos usuários de animais de laboratório para identificar sinais físicos ou comportamentais que afetem o BEA durante o manejo e a manipulação são

qualidades essenciais para a manutenção ou melhoria da sua qualidade de vida dos animais. Pode-se destacar como características essenciais a estes profissionais uma atitude respeitosa para com os animais, vocação, conhecimento, capacitação, experiência e treinamento para identificar fatores que influenciam o BEA (APPLEBY et al., 2011; BAUMANS et al., 2005).

O ambiente pode comprometer o BEA quando este não permite que os animais, tal posto o modelo camundongo, expressem o comportamento natural de sua espécie. Sendo necessário relevar, que os animais são mantidos em restrição de espaço para minimizar as variáveis ambientais que comprometam a reprodutibilidade dos resultados dos ensaios (SPANGENBERG & KEELING, 2015, FURTADO & OLIVEIRA, 2018).

Torna-se fundamental que a estrutura física e o ambiente onde os animais são mantidos, sigam as normas contidas na Resolução Normativa Nº 15, do CONCEA. Essas orientações indicam a ausência ou diminuição da influência dos fatores estressores, como barreiras físicas, isolamento social e superlotação que devem ser identificados e corrigidos (FWC, 2009; APPLEBY et al., 2011; CONCEA, 2013).

No camundongo a linhagem, o sexo e a idade, juntamente com as alterações corporais, fisiológicas (frequência respiratória, cardíaca, temperatura, condição corporal, pressão arterial, entre outros), bioquímicas (enzimas e hormônios relacionados com o estresse), imunológicas, as lesões e a dor, são fatores que devem ser observados para que não haja comprometimento do BEA.

Esquemáticamente podem ser condensados, segundo Fraser (2008) em “Esferas do BEA” (Figura 1), nas quais o BEA é uma área comum a todas as esferas de vida do animal e torna-se um conceito que complementa as cinco liberdades¹, publicado primeiramente em 1993 e posteriormente mencionado e discutido em 2009 (FAWC, 1993; FAWC, 2009).

¹ De acordo com o conceito das cinco liberdades qualquer espécie animal deve estar livre de dor, lesão e enfermidades, livre de desconforto (estresse ambiental); livre de fome, sede e desnutrição; livre de medo e angústia (estresse mental); e livre para expressar seu comportamento natural (FAWC, 1993).

Figura 1: Descrição das *Esferas do BEA*, adaptado de Fraser 2008.



Fonte: Elaboração própria.

2.4.1. Principais causas do comprometimento do BEA em camundongos

Em resumo é possível descrever os tópicos mais importantes para causar o comprometimento do BEA em camundongos em biotério:

i) Usuários de animais de laboratório

- Desconhecimento das características anatômicas e fisiológicas de cada espécie e das variáveis que influenciam a qualidade de vida dos camundongos;
- Incapacidade de identificar e interpretar comportamentos, sinais clínicos e fisiológicos anormais apresentados pelos animais. A interpretação de tais efeitos é essencial, uma vez que somente é possível exercer controle de variáveis cujos efeitos sejam compreendidos;
- Ausência de treinamento, ou realização de treinamento não específico ou aprendizado informal, não baseados nos princípios do BEA, por usuários de animais de laboratório para o exercício de suas funções com os camundongos;

- Não atendimento às normas, presentes na Legislação vigente, para realização de manejo, contenção e procedimentos em animais de laboratório (NEELY et al, 2018, FURTADO & OLIVEIRA, 2018)

ii) Condições ambientais (Resolução Normativa Nº 15, CONCEA, 2013):

- Localização: instalações localizadas em áreas com intenso trânsito de veículos e pessoas;
- Ambientes Físicos: instalações físicas, barreiras sanitárias e de contenção adotadas que são ineficientes em minimizar os fatores estressores físicos e a ocorrência de infecções e promover o bem-estar animal;
- Detalhes Construtivos: teto, paredes e piso construídos inobservadas as normas técnicas presentes na legislação vigente, tais como textura lisa, material resistente e não absorvente, ausência de fissuras ou juntas, junções não formando ângulos agudos, entre outros;
- Alojamento: gaiolas abertas, alta densidade populacional;
- Ruídos: ambiente com ruídos excessivos uniformes e/ou bruscos;
- Vibrações: ambiente sujeito a vibrações devido ao não planejamento quando da construção da edificação que o abriga;
- Iluminação: ambiente com entrada de luz natural, ambiente com iluminação artificial de intensidade inadequada para idade do animal e/ou sem alterações de claro/escuro;
- Temperatura e Umidade: ambiente sem controle sobre as flutuações de temperatura, e com umidade fora da faixa tolerável de 40-60%;
- Ventilação: troca de ar insuficiente e/ou filtração insuficiente do ar.

Ademais, são fundamentais as avaliações da arquitetura das instalações, dos materiais de construção e de acabamento utilizados (tipo de pisos, paredes, portas, janelas, tetos), do tipo de gaiola, do espaço disponível e da forma como é utilizado pelos camundongos (p. ex., espaço para o descanso, espaço para a alimentação, espaço para as excreções e as interações), além das condições climáticas, em ambos os ambientes interno e externo como, por exemplo, vento, correntes de ar, qualidade do ar, odores, altitude, umidade, e vibrações (CONCEA, 2013, SPANGENBERG; KEELING, 2015).

iii) Animais

- Aspectos físicos: comprometimento da sua integridade sanitária ou a intercorrência de doenças durante a criação ou manutenção dos animais;
- Aspectos mentais: susceptibilidade a situações de estresse, traumas emocionais na sua criação, principalmente em sua relação materno-filial e na interação com outros indivíduos durante a fase adulta;
- Aspectos naturais: impossibilidade de expressar repertório comportamental natural da espécie ou se adaptar a novas situações de ambiente ou manipulação (MILLER et al., 2016, FURTADO & OLIVEIRA, 2018);

2.5. A relação entre o desconforto e o estresse de camundongos e os resultados obtidos nos ensaios científicos

Promover o BEA em laboratório não é apenas uma questão ética, mas de considerável importância científica para minimizar a variabilidade, aumentar a reprodutibilidade e melhorar a confiabilidade dos resultados das pesquisas biomédicas envolvendo animais. Por exemplo, segundo Sousa et al. (2018) o estresse causado por contenção durante longos períodos aumenta os níveis de corticosterona no plasma sanguíneo de camundongos. Este é um dos principais hormônios liberados pelo organismo em resposta ao estresse que desencadeia a ativação sequencial da liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRF, em inglês) e da liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Fatores estressores podem ainda afetar fisiologicamente os camundongos de diversas formas. Tsubota et al. (2017) descreve que em roedores, quando expostos repetidamente ao estresse térmico (frio) os animais podem apresentar uma variedade de alterações fisiológicas em diversos órgãos e tecidos, incluindo o cérebro, os sistemas cardiovascular, hemostático e gastrointestinal. (TSUBOTA et al., 2017; SOUSA et al., 2018)

Estresse, dor e/ou desconforto, também definido como distresse, de qualquer natureza tem potencial de causar alterações em diversas áreas do organismo dos camundongos. Estressores leves, como a simples oscilação abrupta de temperatura (≥ 3 °C), podem modular a fisiologia do animal e sua incapacidade de adaptação a essa nova situação causar desconforto e estresse ao animal (IWANIEC et al., 2016; LIAO et al., 2017).

A presença de dor, conforme descrito por Pitcher, et al. (2017) como a dor visceral, ativa mais prontamente a via de estresse/excitação do que a dor somática, quando induzida por estresse crônico em camundongos. Essa via é regulada por receptores tipo Toll 4 (TLR4). Consequente, segundo Tramulla et al. (2014) camundongos com a funcionalidade TLR4 normal, expostos a estresse psicossocial crônico demonstram hipersensibilidade visceral. Fatores estressores, então, possuem a capacidade de influenciar o sistema imunológico de camundongos, como por exemplo, através da ativação do TLR4 que estimulam a liberação de inúmeras citocinas pró-inflamatórias alterando a resposta imune do animal (PITCHER et al., 2017).

Além disso, o estresse psicossocial crônico aumenta a estimulação de outras citocinas, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), que se encontra em níveis significativamente aumentados em camundongos expostos a este tipo de estresse. Por outro lado, camundongos sob estresse causado pela exposição ao frio demonstram tolerância ao desenvolvimento de inflamação sistêmica quando estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (TRAMULLA et al., 2014; PITCHER, et al., 2017; TSUBOTA et al., 2017).

Em 2015, Secklehner & Richardson, demonstraram que no período entre 2011 até 2013, nos estudos publicados em que há indução de doença progressiva e associação com morbi/mortalidade consideráveis não possuíam informações detalhadas sobre o protocolo anestesiológico utilizado e a realização de ponto final humanitário (*end point*). Nos casos aos quais foram aplicados protocolos anestesiológicos, os agentes mais utilizados foram: i) a associação de Cetamina & Xilazina; ii) Isoflurano; iii) Pentobarbital; iv) Tribromoetanol e v) Éter. Contudo, dentre as respectivas substâncias, ao menos três apresentam potencial de comprometer gravemente o BEA: a) Éter: causando irritação de mucosas na indução anestésica e efeito anestésico duvidoso, b) Pentobarbital: margem de segurança restrita (alta mortalidade dose-dependente) e c) Tribromoetanol: efeitos adversos imprevisíveis. Um número ainda mais reduzido de publicações descreveu a administração de agentes anestésicos com propriedades analgésicas em animais expostos à dor pós-cirúrgica não controlada, que é uma fonte importantíssima para dor visceral e somática e mortalidade dos animais (SECKLEHNER; RICHARDSON, 2015; TAGHIPOUR et al., 2016).

Dessa forma, há de se enfatizar a importância do uso de analgésicos em qualquer espécie. Foi possível observar o comprometimento do BEA, sobretudo em camundongos envolvendo procedimentos cirúrgicos na ausência do uso de analgésicos eficientes, principalmente em procedimentos trans e pós-cirúrgicos. Notou-se ainda a ausência ou a

inadequação do uso de analgésicos, particularmente no período pós-operatório e/ou ao longo do estudo com monitoramento clínico adequado, prestação de cuidados paliativos, condições ambientais como temperatura e umidade do ambiente, e dieta mais propícia a animais em recuperação pós-cirúrgica. Esse conjunto de fatores afetam diretamente o BEA e conseqüentemente o andamento e a obtenção dos resultados dos ensaios científicos (SECKLEHNER & RICHARDSON, 2015; TAGHIPOUR et al., 2016).

2.6. Bem-estar animal e a Ciência de Animais de Laboratório

A Ciência de Animais de Laboratório (CAL), antigamente conhecida como *Bioterismo*, não se define somente pelo uso de animais em ambiente laboratorial em ensaios biomédicos para o estudo de mecanismos fisiológicos, imunológicos, genéticos, endocrinológicos e outros. Por si, a CAL apresenta como base o uso da metodologia científica, tecnológica e com caráter inovador, buscar/implementar materiais, equipamentos, metodologias e procedimentos de manejo que possibilitem uma melhor condição dos sistemas fisiológicos, imunológicos, neuroendócrinos e comportamentais dos animais de laboratório. Analisando criticamente essa definição, é oportuno presumir que a CAL possui como fundamento principal a busca pela manutenção do BEA, pois minimizaria possíveis situações de desconforto e estresse o que, por sua vez, conseqüentemente, afetaria todo o sistema biológico dos animais mantidos em biotérios, ou na nomenclatura atualizada, dos Centros de Criação ou Experimentação Animal e não influenciaria nos resultados dos ensaios biomédicos (FRAJBLAT et al., 2008, CONCEA, 2016, NEELY et al., 2018).

A partir desse raciocínio a CAL buscaria transformar a ideia de que o animal de laboratório seja um *Biorreator* para a categoria de *Biomodelo*. A diferença entre a definição de um animal de laboratório como *Biorreator* e de *Biomodelo* é sutil, porém de grande importância. Essa diferença caracteriza-se por: i) *Biorreator* seria o animal de laboratório utilizado nos ensaios científicos apenas com o objetivo de se avaliar uma via biológica específica, o curso da infecção de microrganismos ou a eficácia de um protocolo de quimioterapia experimental. (principalmente quando lidamos com a utilização de animais geneticamente modificados (ANGMs); ii) *Biomodelo*, os modelos animais também são utilizados para as respectivas abordagens como, por exemplo, estudos genéticos, fisiológicos, e imunológicos, porém se impõem o conceito de que o animal é constituído por um sistema biológico complexo e um variado repertório de respostas fisiológicas a depender também de

diversos fatores que podem influenciar diretamente na reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados dos ensaios científicos e biomédicos (FRASER et al., 2008; APPLEBY et al., 2011).

A compreensão do *Biomodelo* precede a escolha do modelo animal ou experimental, pois independente do modelo animal utilizado (primatas não humanos, roedores ou serpentes) se faz necessário desde o conhecimento do *status* genético, a qualidade da estrutura física de sua manutenção, o uso de materiais e manejo adequados para cada espécie, pois são imprescindíveis à estruturação do *Biomodelo* e somente assim poderá ser utilizado como um eficiente modelo experimental eticamente correto durante os ensaios biomédicos (ANDRADE et al., 2002; CONCEA, 2016).

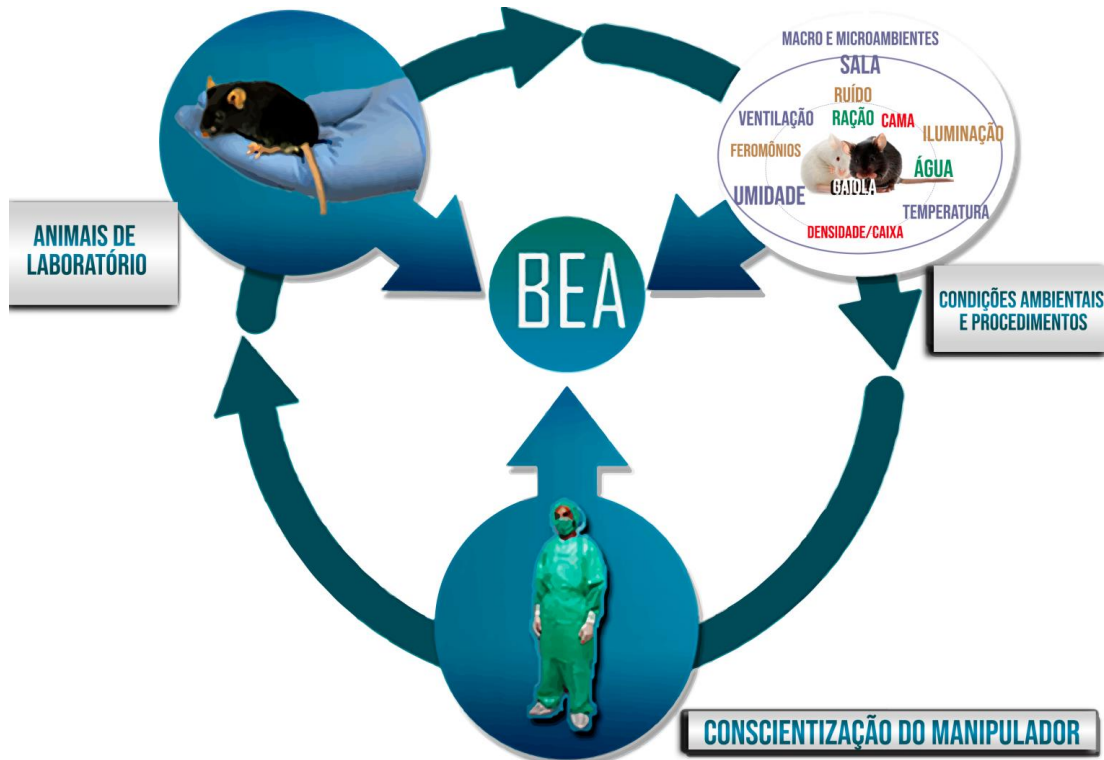
Além disso, existe uma legislação nacional específica para o uso de animais de laboratório, onde o CONCEA atua de forma dinâmica por meio de RNs na busca de orientar as CEUAs a licenciarem projetos somente se não houver métodos alternativos ou pela utilização de métodos refinados que minimizem o desconforto dos animais e preservem o BEA (BRASIL, 2008). Apesar desta regulamentação é determinante que apenas um intenso trabalho de sensibilização, informação e educação continuada (em alguns casos de reeducação) seja possível transformar a mentalidade e a conscientização sobre a importância da manutenção do BEA em laboratórios, pois não está somente relacionado à qualidade de vida do animal dentro do biotério (que por si própria já seria o ponto mais importante), mas também na questão da aquisição, reprodutibilidade e confiabilidade, e conseqüentemente no uso ético através da redução do número de animais utilizados na pesquisa. Há a convicção em afirmar que esse problema na pesquisa somente será resolvido quando o BEA em laboratório for fortemente considerado, e metodologias adequadas forem aplicadas em conformidade com o que está descrito nas Leis.

Porém, como descrito por Rivera (2017) o BEA, também depende das decisões éticas adotadas pelo manipulador em sua rotina diária quando de acordo com os procedimentos aprovados pela CEUA e relevando através de sua conscientização, prioritariamente, a manutenção do BEA em laboratório (LAPCHIK, et al., 2017). Também deve ser relevado que o desenvolvimento da CAL deve ser norteado sob o ponto de vista da implementação de projetos de desenvolvimento em inovação e tecnologias que possibilitem testar a eficiência do uso dos produtos, materiais e procedimentos quanto a promoção do BEA.

3. JUSTIFICATIVA

A hipótese desse trabalho baseia-se, primordialmente, na relação direta pela qual quanto melhor for aplicado e mantido o BEA em centros de criação e experimentação animal, maior será a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos durante os ensaios científicos. Dessa forma foi elaborada a Teoria do Círculo Virtuoso entre *BEA & Qualidade Científica* (Fig. 2). Esta teoria foi fundamentada na consulta de diversos manuais de procedimentos para uso de animais de laboratório, principalmente a DBCA/CONCEA e "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Foi aplicada, ainda, uma visão crítica e percepção da relação de manejo homem/animal durante o período de experiência profissional na área de CAL (CONCEA, 2016).

Figura 2: Teoria do Círculo Virtuoso entre *BEA* & *Qualidade Científica*. Os principais componentes do respectivo Círculo Virtuoso são compostos de uma padronização, adaptação e rotina dos fatores ambientais como luminosidade; umidade; temperatura e outros; conscientização do manipulador aos princípios éticos, legislação e sensibilidade na execução dos procedimentos envolvendo animais; alta qualidade na criação e manutenção dos animais, em relação ao aspecto comportamental, sanitário e genético.



Fonte: Elaboração própria.

Esta teoria é proposta, através das definições de BEA no qual relaciona o estado de equilíbrio entre o animal e o ambiente, de forma a melhor se adaptar e por fim minimizar alterações fisiológicas e, principalmente, o gasto energético do seu metabolismo. Partindo do princípio do conhecimento biológico e comportamental da respectiva espécie utilizada em laboratório somado a uma infraestrutura física, equipamentos e materiais que estejam padronizados e de acordo com critérios científicos que ofereçam ao animal uma acomodação e manutenção satisfatória ao seu BEA (CONCEA, 2015; CONCEA, 2016).

É notável que, mesmo que o macro e o microambiente estejam em conformidade com os princípios éticos, a Legislação vigente e que estruturalmente o BEA esteja contemplado, o fator manejo praticado pela relação homem/animal, pode ser comprometedora a toda estrutura

física adequada e promover alto desconforto, estresse e dor ao animal, ou seja, comprometendo o BEA (PACCA et al., 2008).

A primeira questão nessa relação deve ser o respeito do manipulador pelo animal, em qualquer espécie, levando em consideração que o animal utilizado é um ser senciente e que é capaz de sentir desconforto e dor como um ser humano. Esse fato é facilitado quando há uma maior empatia entre o manipulador e o animal, situação que pode ser melhor avaliada na relação de manejo com primatas não humanos, uma vez que são animais que expressam maior grau de interação com os humanos (PACCA et al., 2008). Outro importante ponto é a sensibilização e a conscientização do manipulador em realizar o manejo da forma ética e observando durante sua rotina diária que todos os procedimentos devam preservar o BEA. Esse fato pode ser comprometedor quando é necessário considerar fatores psicossociais e emocionais de cada pessoa e sua interação social diária com os animais (ANDRADE et al, 2002).

Dessa forma, enfatiza-se a necessidade de um intenso processo de sensibilização e conscientização do manipulador (pesquisador, técnico, aluno) sobre a importância do BEA, para que haja a minimização desse ponto do círculo virtuoso, tornando-se, assim, melhor a relação ser humano/animal e elevando o BEA. Tal conscientização é justificada mediante a demonstração criteriosa de que o comprometimento do BEA poderá influenciar diretamente nos resultados científicos, acarretando, principalmente, no não cumprimento dos princípios éticos de redução e refinamento, com perdas desnecessárias de vidas, de reagentes, de tempo de execução e implicação direta na confiabilidade e na reprodutibilidade dos resultados científicos (ANDRADE et al, 2002).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O objetivo primordial é demonstrar que o BEA, além de ser uma questão ética de extrema relevância, possui uma marcante importância na utilização dos animais para fins científicos. Através da legislação nacional, dos princípios éticos e dos dados e resultados científicos, objetiva-se demonstrar que as diversas formas de comprometimento do BEA são capazes de interferir diretamente nos resultados dos ensaios utilizando o biomodelo camundongo.

4.2. Objetivos específicos

- Realizar uma criteriosa e detalhada análise de Descritores e, por conseguinte uma minuciosa revisão bibliográfica relacionando o comprometimento do BEA e sua influência na confiabilidade dos ensaios científicos e dos seus respectivos resultados;
- Promover sensibilização e conscientização entre os usuários de animais de laboratório sobre a importância da promoção do BEA durante a relação homem/animal em sua rotina diária em centros de criação e experimentação;
- Demonstrar a necessidade de testar e validar materiais e insumos, conforme descrito pelo CONCEA, mensurando o BEA de cada animal através da preferência entre diversos materiais/produtos, através do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI);
- Salientar que o uso de materiais, equipamentos, produtos e procedimentos que promovam o BEA, além de serem técnicas de refinamento durante a estruturação do desenho experimental, têm potencial de elevar a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados e, conseqüentemente, diminuir o número dos animais utilizados para fins científicos.
- Através da criação de um código QR, produzir um *e-Book*, continuamente atualizado, reunindo informações técnicas e científicas, que demonstrem de forma coesa, concisa e dinâmica a influência do BEA nos resultados de ensaios científicos que utilizem biomodelo camundongo.

5. METODOLOGIA

5.1.Revisão Teórica

A metodologia dessa dissertação foi baseada numa revisão bibliográfica minuciosa e detalhada, com o intuito de contextualizar a proposta, descrevendo inicialmente a evolução pela busca do BEA durante a história do desenvolvimento científico e tecnológico no Brasil e no resto do mundo. A fonte da primeira revisão foi embasada na DBCA/CONCEA, no Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou

Pesquisa Científica (BRASIL, 2016b), bem como em todas as Resoluções Normativas publicadas até o presente momento, direcionadas à preservação do BEA.

Dentre todos os modelos animais utilizados, nos quais a aplicação do BEA é de extrema importância, neste estudo foi fixado apenas no modelo camundongo. Tal escolha se baseou no fato de que este consiste em um dos modelos mais utilizados para os ensaios biomédicos. Também, em virtude da sua alta similaridade genética com o ser humano e o conjunto de resultados preliminares, além dos anos de estudo do nosso grupo de pesquisa em relação ao BEA do referido animal. A partir disso, definiram-se os principais pontos que podem comprometer o BEA desses animais, tais como: macro e microambiente, piso, manejo, eutanásia, entre outros. Dessa forma, pôde-se obter resultados quantitativos com base na análise de Descritores desenvolvida através do uso do sistema de palavras-chaves, previamente determinados, aplicando nos sítios de publicações indexadas e dados qualitativos e críticos através da pesquisa direta do material.

5.2. Análise de Descritores e Levantamento Bibliográfico

Primeiramente, foi realizada uma análise de Descritores através de buscas no sistema de classificação de assuntos, e componente integrador da Biblioteca Virtual em Saúde, o DeCS – Descritores em Ciências da Saúde (<http://decs.bvs.br/>), usando os seguintes termos, chamados de “Raiz” de nossa pesquisa: (A) Bem-Estar de Animais de Laboratório e (B) *Animal Welfare*:

Figura 3: Metodologia de busca no DeCS. O trabalho possui como fundamento a relação entre o BEA e os resultados dos ensaios científicos. Então, a palavra-chave “Raiz” para ser utilizada do DeCS foi Bem-Estar Animal e Welfare. Pois como demonstrado em (A), quando utilizamos o termo Bem-Estar de Animais de Laboratório o descritor não encontra dados. Contudo, quando são utilizados os descritores Animal Welfare e Bem-Estar do Animal, encontram-se correlações relativas a essas palavras-chaves e indicadores para o respectivo descritor (B).

A

Logo: bvs biblioteca virtual em saúde DeCS Descritores em Ciências da Saúde

Logos: Organização Pan-Americana da Saúde, Organização Mundial da Saúde, BIREME Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde

Pesquisa sobre: BEM ESTAR ANIMAIS DE LABORATORIO
Descritores Encontrados: nenhum

O descritor *Bem Estar Animais de Laboratório* não foi encontrado
Consulte outra palavra ou mude o IDIOMA DOS DESCRITORES

Botões: Voltar, Nova Consulta

B

Logos: Organização Pan-Americana da Saúde, Organização Mundial da Saúde, BIREME Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde

Pesquisa sobre: ANIMAL WELFARE
Descritores Encontrados: 1
Mostrando: 1 .. 1

1 / 1 DeCS

Descritor Inglês:	Animal Welfare
Descritor Espanhol:	Bienestar del Animal
Descritor Português:	Bem-Estar do Animal
Sinônimos Inglês:	Animal Cruelty Cruelty, Animal Welfare, Animal
Categoria:	101.880.604.100
Definição Inglês:	The protection of animals in laboratories or other specific environments by promoting their health through better nutrition , housing , and care.
Relacionados Inglês:	Animal Use Alternatives Euthanasia, Animal
Nota Histórica Inglês:	1986
Qualificadores Permitidos Inglês:	EC economics HI history OG organization & administration SN statistics & numerical data ES ethics LJ legislation & jurisprudence ST standards TD trends
Número do Registro:	19637
Identificador Único:	D000827

Botões: Nova Consulta, Config, V

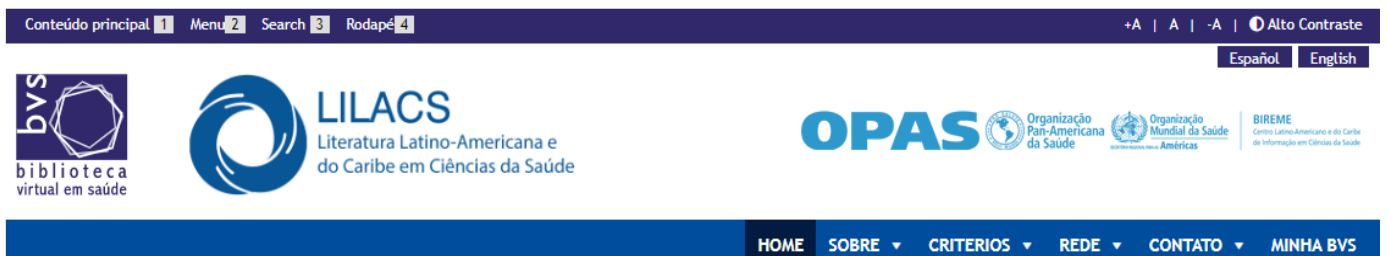
Fonte: Elaboração própria.

A partir disso, foram realizadas buscas nas bases de dados científicas apontadas pelo DeCS, através de seus qualificadores, que poderiam fornecer quantitativa e qualitativamente informações mais relevantes sobre o respectivo assunto. Baseando-se em relevância e robustez das bases de dados, foram utilizados sítios de publicações indexadas:

A) *PubMed (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine)*, no módulo PUB MED (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>);



B) *LILACS/BIREME (Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde)*, no módulo Todos os Índices (<https://lilacs.bvsalud.org/>);



C) *SciELO (SciELO - Scientific Electronic Library Online)*, no método Integrado (<http://www.scielo.br/>).



serial browsing

alphabetic list
subject list
search form

article browsing

author index
subject index
search form

reports

site usage
Publishing statistics
journal citation
co-authors

A análise de Descritores e o levantamento bibliográfico foram estruturados, utilizando o termo booleano AND, para ser inclusivo e não excludente entre os termos relacionados ao assunto que objetivou-se estudar. Por exemplo, como descrito na tabela abaixo: em relação ao descritor Bem-estar animal, foram utilizados os termos: “Bem-Estar AND Animais de Laboratório”.

Os estudos foram elegíveis quando fatores capazes de interferir no estado de homeostase dos animais de laboratório foram relatados, pois procurou-se identificar quando esses fatores podem influenciar potencialmente o resultado de ensaios científicos. De todos os estudos relevantes foram extraídas informações referentes ao fator de influência nos animais, e a interferência produzida nestes e/ou nos resultados dos ensaios científicos.

Tabela 1: Estrutura da análise de Descritores e do levantamento bibliográfico através da correlação das palavras-chave escolhidas através do DeSC

Descritor Principal	Modelo Animal	Comprometimento do BEA	Causas do Comprometimento do BEA
Bem-Estar	Animais de Laboratório Camundongo	Estresse	Condições Ambientais
		Distresse	Caixa/Piso
		Desconforto	Temperatura
		Dor	Ração/Água
		Corticosterona	População
		ACTH	Comportamento
		CRH	Manejo
		Neurotransmissores	E. Ambiental

O descritor e foco principal deste trabalho foi a palavra-chave Bem-estar, concomitantemente, através do refinamento da busca, com o modelo Camundongo. A partir desse binômio foi realizada a associação de até quatro palavras combinadas que direcionaram a busca pelos manuscritos relacionados ao assunto e forneceram dados quantitativos relativos a cada sítio de periódicos indexados.

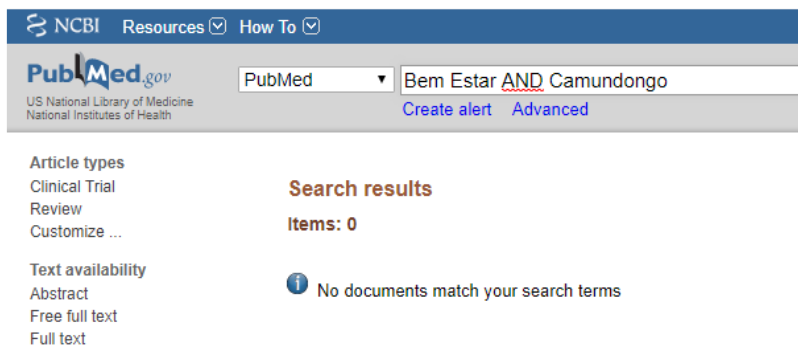
Em síntese, a análise de Descritores foi baseada na determinação de palavras-chaves relacionadas ao BEA e realizada a combinação com palavras-chave relacionadas ao

comprometimento de BEA no modelo camundongo. Importante frisar que foram utilizados os termos em português e inglês, alcançando assim maior abrangência bibliográfica.

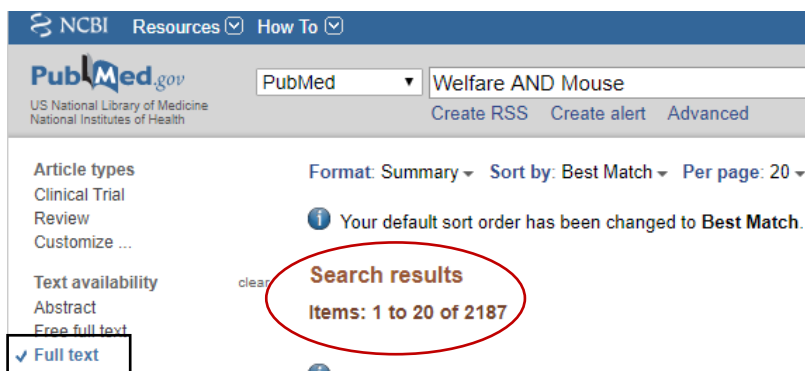
Então, por exemplo, foram associadas as seguintes palavras-chaves (em Português e Inglês), Bem estar AND Camundongo e Welfare AND Mouse.

Figura 4: Exemplo do levantamento de dados no sítio Pub Med. Apenas como ilustração do processo de análise de Descritores e do levantamento bibliográfico, demonstrou-se a utilização de dois pares de palavras-chaves (A) Bem-Estar AND Camundongo e (B) Welfare AND Mouse. No círculo vermelho, obteve-se o número em cada sítio do número de trabalhos indexados relacionados aos descritores, sendo que somente foram utilizados textos acessíveis (retângulo preto), a fim de possibilitar a análise do conteúdo do manuscrito e realizar o levantamento bibliográfico.

A)



B)



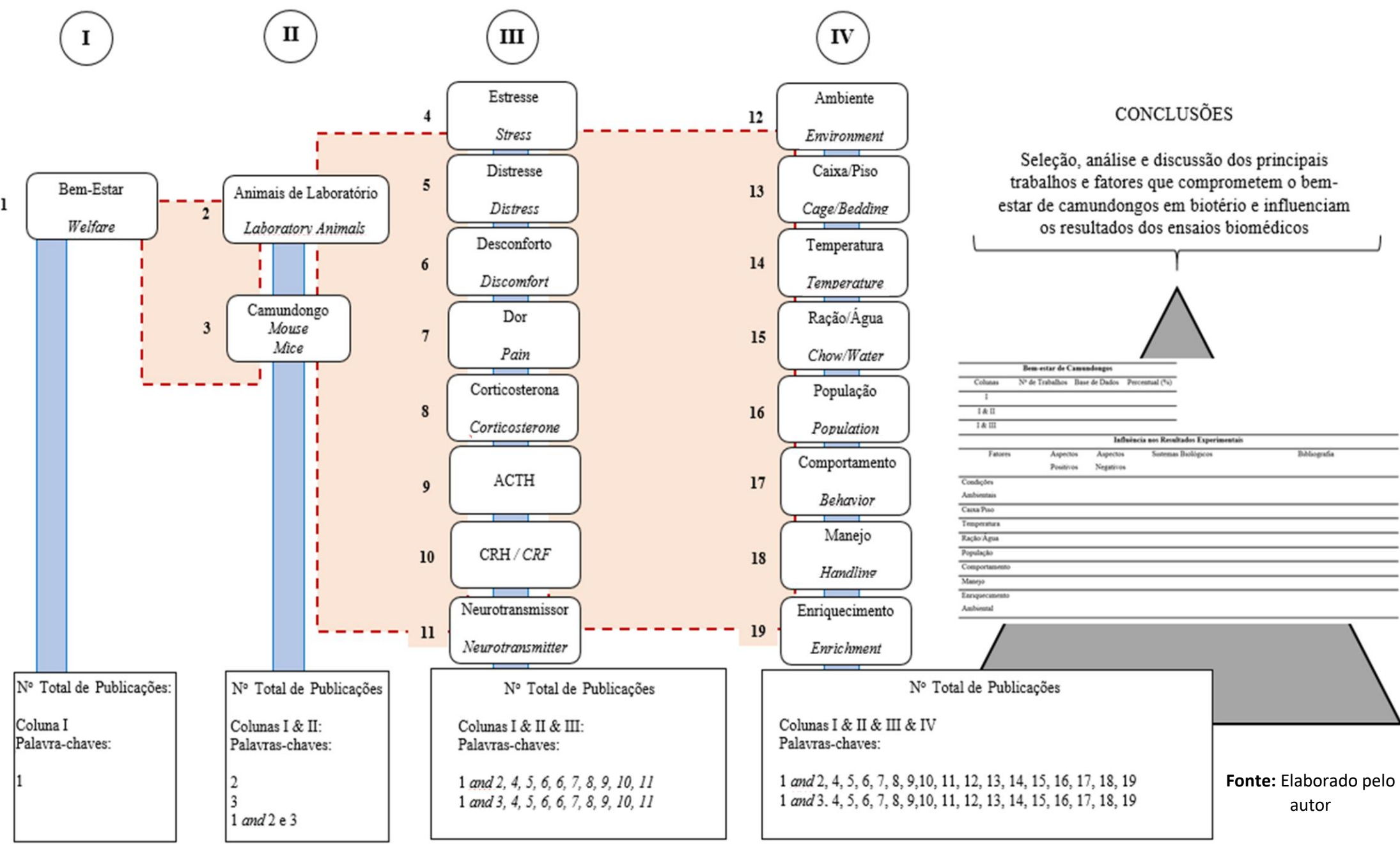
Dessa forma, foi possível determinar em cada sítio de dados indexados a quantificação do número de trabalhos disponíveis que envolvem animais de laboratório e os fatores que podem elevar ou comprometer o seu manejo.

Além disso, foram qualificadas as informações a partir de um levantamento, também através da localização das respectivas palavras-chaves em aspectos positivos, negativos e sua influência nos sistemas biológicos animais e buscando através do número para cada quesito aplicar o valor percentual e testes de significância estatística como o Teste T student ($p \leq 0.05$), indicada nas figuras por um asterisco.

Estruturou-se, assim, uma base de dados que possibilitou uma profunda discussão acerca das diversas variáveis que influenciam o BEA e que, conseqüentemente, podem comprometer diretamente os resultados de ensaios tecnológicos e científicos.

No organograma a seguir é descrita a associação das correlações de todas as palavras-chaves usadas para realizar a análise de Descritores e a seleção dos principais manuscritos relacionados ao assunto:

Figura 5: Organograma demonstrativo do esquema de associações das palavras-chave utilizadas na análise de Descritores e no levantamento bibliográfico.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.3. VIDEO ABSTRACT

Um resumo deste trabalho em formato de apresentação de slides dos resultados desta dissertação denominado Video Abstract, foi editado no Programa Video Movie Maker, em formato .mp4 e, posteriormente hospedado na plataforma Google Drive, podendo ser acessado em modo de visualização através de código QR. Trata-se de um código de barras bidimensional que pode ser facilmente escaneado, usando a maioria dos telefones celulares equipados com câmera. Esse código pode ser convertido em texto (interativo), em endereço URL, em um número de telefone, uma localização georreferenciada, um e-mail, um contato ou até mesmo em SMS. O código QR, por sua vez, foi gerado através do aplicativo QR code Generator disponível na Chrome Web Store no sítio [<https://chrome.google.com/webstore/detail/the-qr-code-generator/gcmhlmapohffdgflokbgknlknnmogbb?hl=pt-BR>].

6. ESTADO DA ARTE

Atualmente tem se produzido uma quantidade significativa de pesquisas conhecidas pela denominação “estado da arte” ou “estado do conhecimento”. São pesquisas de caráter bibliográfico, com metodologia inventariante da produção acadêmica e científica sobre o tema que busca investigar, que tem como foco mapear a produção acadêmica em diversos campos do conhecimento, compilando dados sobre o que já vem sendo pesquisado e quais aspectos estão em destaque (FERREIRA, 2002).

Como cada ciência encontra pontos contraditórios, correlacionar dados presentes na literatura tem a capacidade de servir como uma chave para a interpretação de diversos fenômenos. Ademais, para buscar o que ainda não foi feito é necessário conhecer o que já construído (FERREIRA, 2002; TOROPOV; TOROPOVA, 2020).

7. RESULTADOS

A revisão bibliográfica revelou que as palavras-chave utilizadas, bem como o idioma (português ou inglês) e a base de dados impactam de forma significativa no número de publicações indexadas.

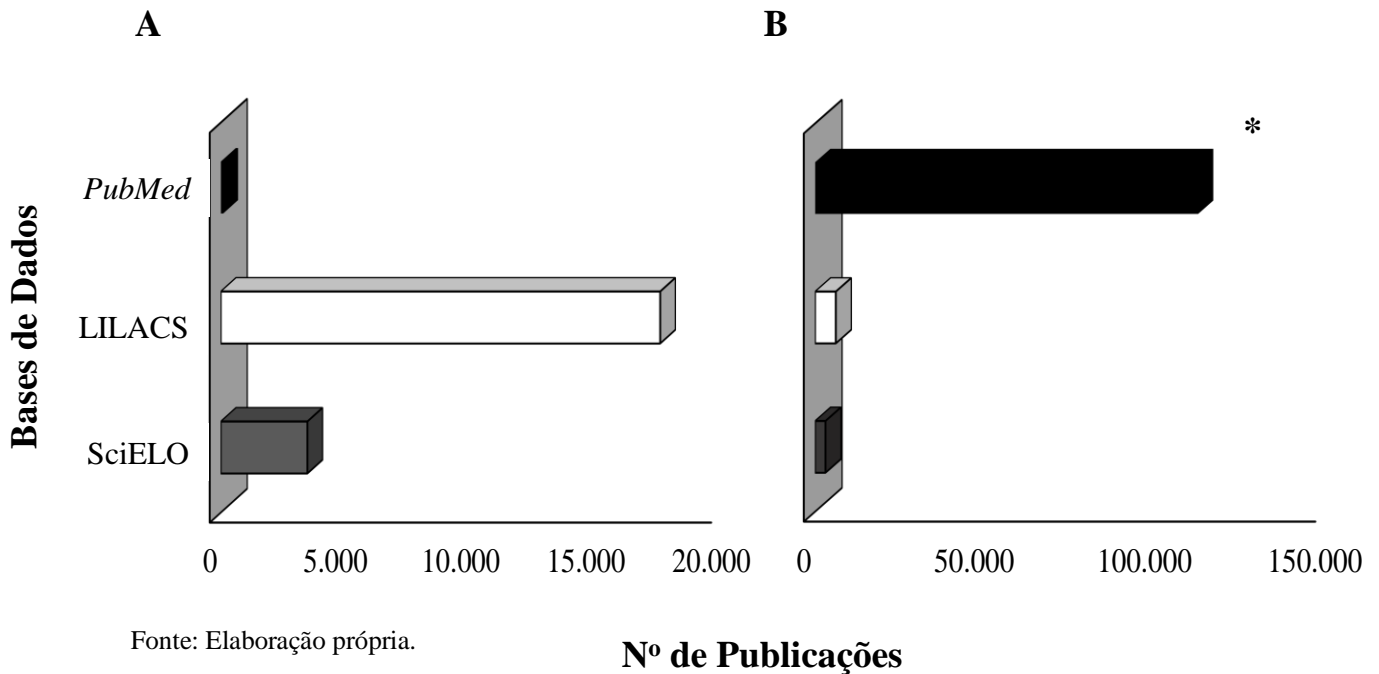
A busca nas bases de dados *PubMed*, LILACS, e SciELO, forneceram os dados que tornaram possível realizar uma importante análise de Descritores das publicações indexadas relacionadas ao objetivo de estudo e iniciar a seleção dos trabalhos que respondessem a nossa hipótese de trabalho.

7.1. Análise de Descritores

Seguindo o DeCS, foi dado início a busca com a palavra-chave *Bem-Estar* ou *Welfare* (Fig. 6). Foi observado que na base de dados LILACS, a palavra-chave *Bem-Estar* apresentou 17.518 publicações indexadas, enquanto no SciELO foram obtidas 3.450 e no *PubMed* apenas 93 trabalhos relacionados a respectiva palavra-chave. A base de dados LILACS, em percentual, foi 99% superior a *PubMed* e 80% quando comparada com a SciELO (Fig. 6A). Contudo, quando foi empregada a palavra-chave *Welfare* a base de dados com maior número de publicações foi o *PubMed* (112.883), seguido do LILACS (6.054) e por último o SciELO (3.021) (Fig. 6B). A base de dados *PubMed*, em percentual, foi 95% superior a LILACS e 97% quando comparada com a SciELO.

Quando foi comparado o número de publicações, entre os idiomas, pelas bases de dados com maior número de publicações, verificou-se que a palavra-chave *Welfare* no *PubMed* foi 84% superior a LILACS com a palavra-chave *Bem-estar*.

Figura 6: Análise de Descritores entre os descritores *Bem Estar* e *Welfare*. Observou-se uma diferença na obtenção de trabalhos indexados entre a palavra-chave *Bem-Estar* (A) e *Welfare* (B) entre as bases de dados *PubMed* (Barra Preta), LILACS (Barra Branca) e a SciELO (Barra Cinza). O asterisco foi relativo a significância estatística ($p \leq 0,05$) entre a palavra-chave *Welfare* no banco de dado *PubMed*.

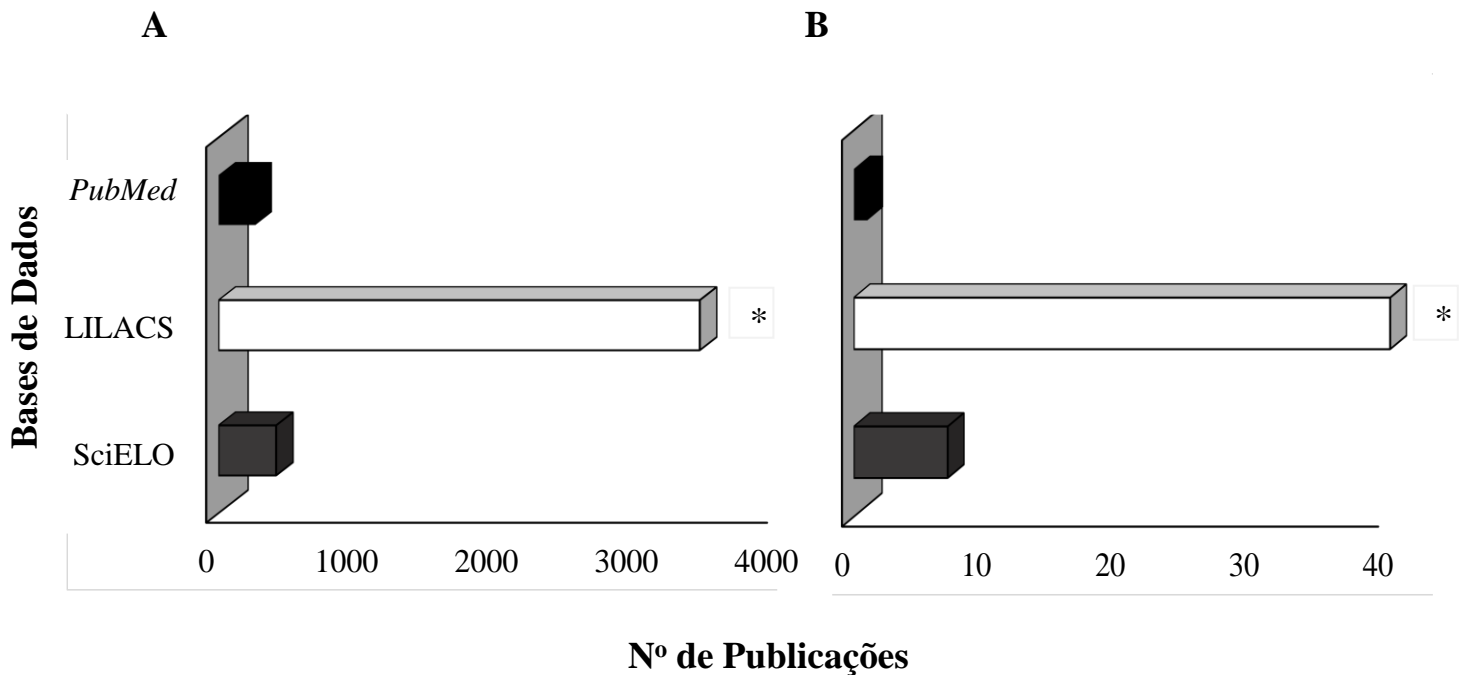


Fonte: Elaboração própria.

Nº de Publicações

A partir da associação das palavras-chaves diretamente relacionadas ao BEA (Bem-Estar e Welfare) realizou-se a combinação pelo termo booleano AND entre a palavra-chave Bem-Estar AND Animais de Laboratório nas respectivas bases de dados (Fig. 7). A base de dados LILACS apresentou 3.431 publicações indexadas para a palavra-chave Animais de Laboratório, enquanto na SciELO foram obtidas 410 e na PubMed demonstrou 26 publicações indexadas (Fig. 7A). Contudo quando associou-se Bem-Estar AND Animais de Laboratório o número de publicações indexadas diminuiu significativamente, porém manteve a proporcionalidade entre a base de dados: LILACS (40 publicações); SciELO (7 publicações) e PubMed (1 publicação) (Fig. 7B). Foi observado que o estudo para o BEA, dentro da área da ciência de animais de laboratório, na principal base de dados (LILACS) é de 1,2% do total de trabalhos em animais de laboratório.

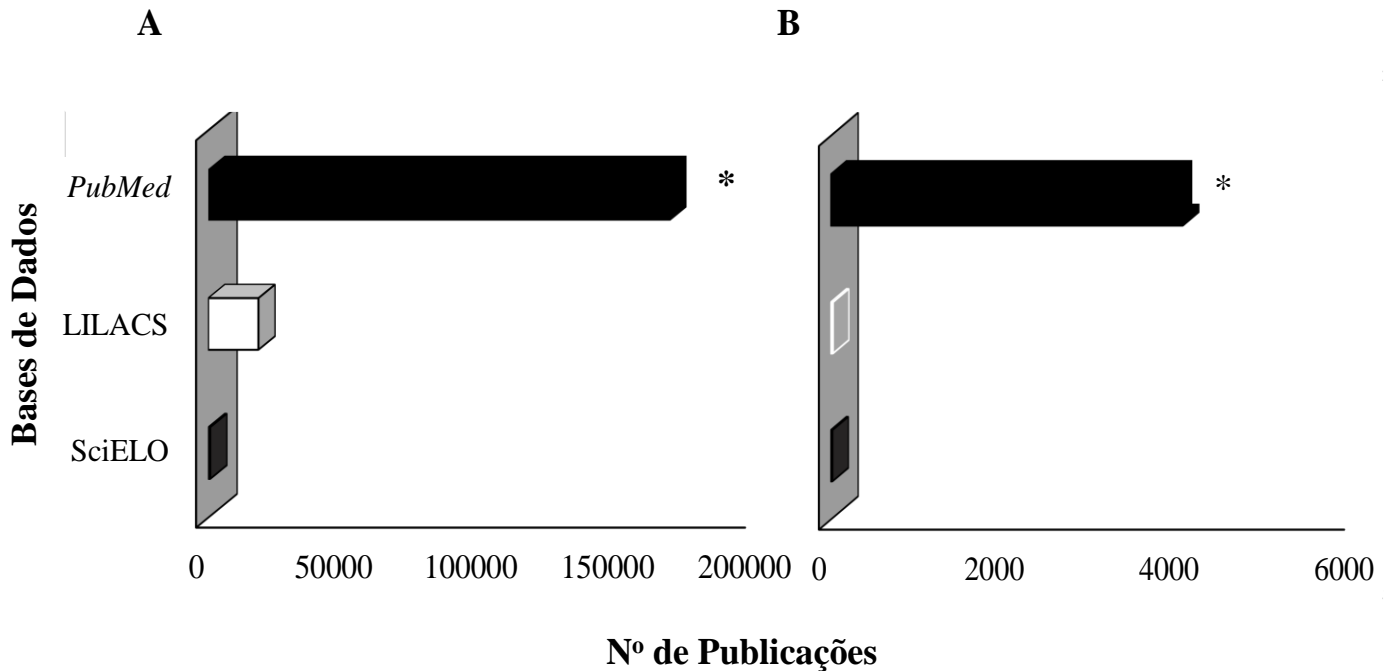
Figura 7: Análise de Descritores entre os descritores *Animais de Laboratório* e *Bem-estar*. Observou-se uma diferença na obtenção de trabalhos indexados entre as palavras chaves: *Animais de Laboratório* (A) e *Bem-estar AND Animais de Laboratório* (B) nas respectivas bases de dados *PubMed* (Barra Preta), *LILACS* (Barra Branca) e a *SciELO* (Barra Cinza). O asterisco foi relativo à significância estatística ($p \leq 0,05$) para a base *LILACS* demonstrou o maior número de trabalhos relacionados aos *Animais de Laboratório* quando a palavra-chave se encontrava no idioma português.



Fonte: Elaboração própria.

A utilização dos termos no idioma em inglês: *Welfare* e *Laboratory Animal* (Fig. 8), também com a utilização do termo booleano *AND*, apresentou entre as bases de dados os seguintes resultados: i) Palavra-chave *Laboratory Animal*, na base de dados *PubMed* (1.682.86 publicações); *LILACS* (18.263 publicações) e *SciELO* (703 publicações) (Fig. 8A). A associação entre *Welfare AND Animal Laboratory* demonstrou o respectivo número de publicações: i) *PubMed* (4.024); *LILACS* (27) e *SciELO* (21) (Fig. 8B). Estes valores representam que o estudo do BEA em animais de laboratório em sítios de publicações indexadas em todo mundo foi de 2,4%.

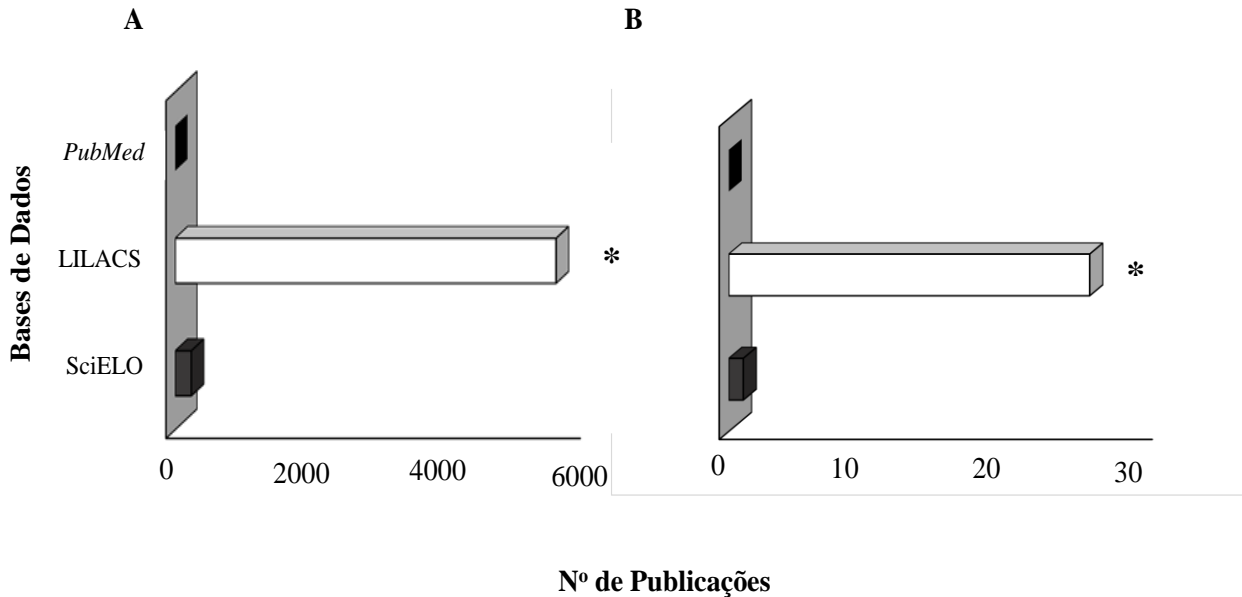
Figura 8: Análise de Descritores entre os descritores *Laboratory Animal* e *Welfare*. Observou-se uma diferença na obtenção de trabalhos indexados entre as palavras chaves: *Laboratory Animal* (A) e *Welfare AND Laboratory Animal* (B) nas bases de dados *PubMed* (Barra Preta), LILACS (Barra Branca) e a SciELO (Barra Cinza). O asterisco foi relativo à significância estatística ($p \leq 0,05$) para a base *PubMed* demonstrou o maior número de trabalhos relacionados aos *Laboratory animal AND Welfare* quando a palavra-chave se encontrava no idioma inglês.



Fonte: Elaboração própria.

Prosseguindo a correlação, nesse momento associando o BEA ao modelo animal camundongo, a análise de Descritores nas respectivas bases de dados demonstrou que a palavra-chave Camundongo manteve o padrão anteriormente observado com a maior quantidade de publicações indexadas (Fig. 9) encontradas na LILACS (5.515 publicações), seguindo de 233 publicações na SciELO e nenhuma encontrada na PubMed (Fig. 9A). Através da associação entre as palavras-chaves Camundongo AND Bem-Estar, observou-se que o número de publicações também mantém o padrão biométrico, apresentando uma queda significativa no número de trabalhos publicados, tendo um número relativamente maior na LILACS (25 publicações) quando comparada com as outras (SciELO: 1 publicação e PubMed: 0) (Fig. 9B). Especificamente para o modelo camundongo, verificou-se um total de 0,5% do total de publicações indexadas na base de dado de maior número de trabalhos apresentados no idioma em português.

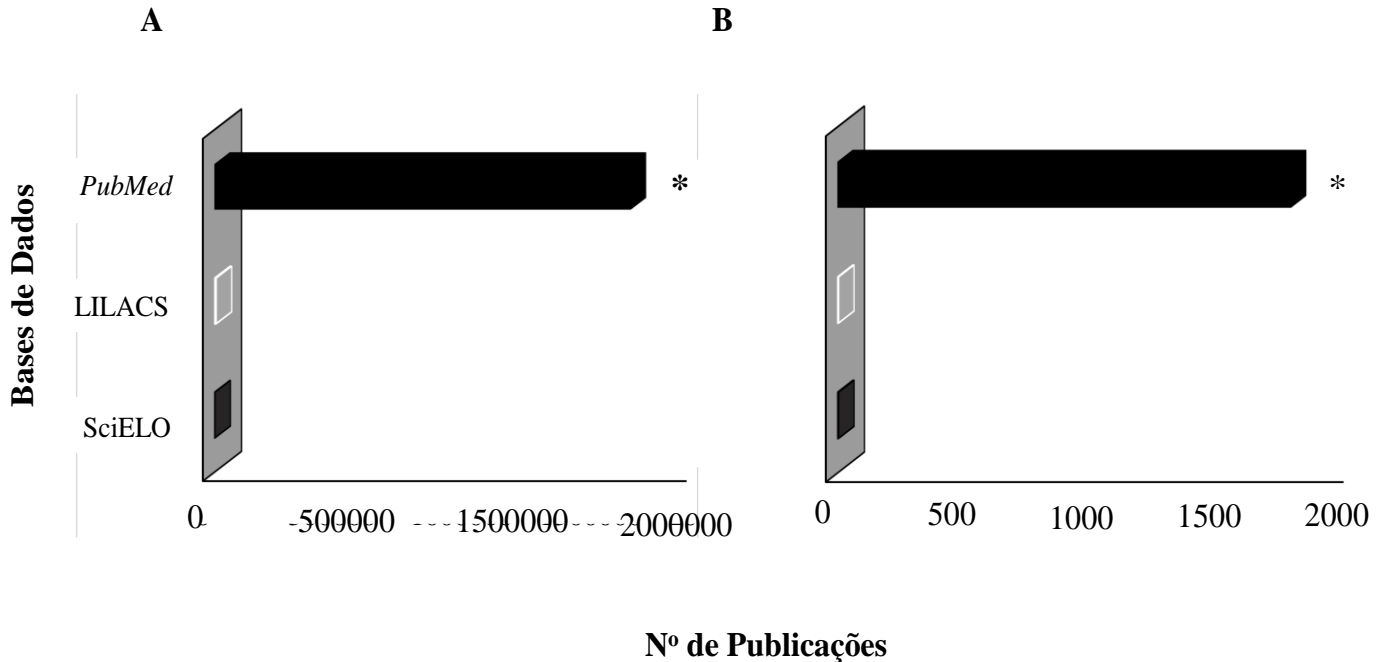
Figura 9: Análise de Descritores entre os descritores *Camundongo* e *Bem-estar*. Observou-se uma diferença na obtenção de trabalhos indexados entre as palavras chaves: *Camundongo* (A) e *Bem-estar AND Camundongo* nas bases de dados *PubMed* (Barra Preta), *LILACS* (Barra Branca) e a *SciELO* (Barra Cinza). O asterisco foi relativo à significância estatística ($p \leq 0,05$) para a base *LILACS* que demonstrou o maior número de trabalhos relacionados aos termos *Camundongo AND Bem-estar* quando a palavra-chave se encontrava no idioma português



Fonte: Elaboração própria.

Em relação ao idioma em inglês, o número de publicações foi significativamente superior nas palavras-chaves *Mouse* (relativa a *Camundongo*) e a associação de *Mouse AND Welfare* (relativa a *Camundongo AND Bem-Estar*). Além disso, conforme descrito anteriormente a base de dados *PubMed* apresentou o maior número de publicações indexadas (Fig. 10). A palavra-chave *Mouse* apresentou 1.607.940 publicações no sítio de busca *PubMed*, enquanto que na *LILACS* foram observadas 6.099 publicações e 1.282 publicações na *SciELO* (Fig. 10A). Vale ressaltar que, quando comparadas, as palavras chaves *Mouse* ou *Mice*, separadamente, no *PubMed* o número de publicações foi semelhante, porém a palavra-chave *Mouse* ainda foi a que apresentou a maior quantidade de trabalhos publicados (*Mouse*: 1.607.940; *Mice*: 1.527.517 publicações). Novamente, na associação entre o *BEA* e o modelo animal (*Mouse AND Welfare*) houve uma significativa redução do número de publicações, proporcionalmente, nas respectivas bases de dados: (*PubMed*: 1.755; *LILACS*: 4 e *SciELO*: 4 publicações) (Fig. 10B). Esses valores correspondem em percentual ao estudo de *BEA* em camundongos a aproximadamente 0,1 a 0,3% das publicações indexadas nas respectivas bases de dados.

Figura 10: Análise de Descritores entre os descritores *Mouse* e *Welfare*. Observou-se uma diferença na obtenção de trabalhos indexados entre as palavras chaves: *Mouse* (A) e *Welfare AND Mouse* (B) nas bases de dados *PubMed* (Barra Preta), LILACS (Barra Branca) e a SciELO (Barra Cinza). O asterisco foi relativo à significância estatística ($p \leq 0,05$) para a base *PubMed* demonstrando o maior número de trabalhos relacionados aos *Mouse AND Welfare* quando a palavra-chave se encontrava no idioma inglês.



Fonte: Elaboração própria.

Complementando o levantamento biométrico, foi realizada a associação entre as principais palavras-chaves Camundongo, Bem-Estar e relacionadas aos Marcadores de Estresse, através do termo booleano AND nas respectivas bases de dados descritas na metodologia proposta: PubMed, LILACS e SciELO. Além disso, foi feita a comparação entre o número de publicações que foram diretamente relacionadas ao BEA pela utilização da palavra-chave Bem-Estar (*Welfare*) ou indiretamente ao comprometimento do BEA pela palavra-chave Estresse (*Stress*) e outras palavras chaves relacionadas ao assunto (Tabela 2).

Tabela 2: Análise de Descritores das palavras-chave relacionando o BEA e a modulação do estresse

Palavras-chaves	Bases de Dados		
	<i>PubMed</i>	LILACS	SciELO
<i>Bem-Estar AND Animal de Laboratório</i>	1	40	7
<i>Bem-Estar AND Camundongo</i>	0	25	1
<i>Laboratory Animal AND Welfare</i>	4.024	27	21
<i>Mouse AND Welfare</i>	1.755	4	4
<i>Estresse AND Camundongo</i>	0	158	6
<i>Stress AND Mouse</i>	77.294	213	50
<i>Distresse AND Camundongo</i>	0	0	0
<i>Distress AND Mouse</i>	2.046	14	2
<i>Desconforto AND Camundongo</i>	0	3	0
<i>Discomfort AND Mouse</i>	311	1	2
<i>Dor AND Camundongo</i>	0	82	4
<i>Pain AND Mouse</i>	18.664	88	12
<i>Corticosterona AND Camundongo</i>	0	11	0
<i>Corticosterone AND Mouse</i>	6.127	9	2
<i>ACTH AND Camundongo</i>	0	15	0
<i>ACTH AND Mouse</i>	3.362	15	1
<i>CRH AND Camundongo</i>	0	2	0
<i>CRF AND Mouse</i>	1.245	4	3
<i>Neurotransmissor AND Camundongo</i>	0	2	0
<i>Neurotransmitter AND Mouse</i>	125.713	25	5
TOTAL	240.542	738	120

Em resumo, o refinamento do levantamento biométrico, auxiliou na revisão bibliográfica. Foi possível ilustrar que a base de dados com maior número de publicações indexadas relacionando o BEA a camundongos foi a *PubMed*. Sendo que as palavras-chaves com maior número de trabalhos indexados relacionados à manutenção do BEA ou o comprometimento do BEA (estresse) foram:

- 1) *Neurotransmitter AND mouse*: 125.713 publicações;
- 2) ***Stress AND mouse*: 77.294 publicações;**
- 3) *Pain AND mouse*: 18.664 publicações;
- 4) *Corticosterone AND mouse*: 6.127 publicações;
- 5) *ACTH AND mouse*: 3.362 publicações;
- 6) *Distress AND mouse*: 2.046 publicações;
- 7) *CRF AND mouse*: 1.245 publicações.

Por fim, quando se realizou a correlação entre três termos descritivos (Tabela 3), os resultados demonstraram uma diminuição maior do número de publicações indexadas em relação ao comprometimento do BEA e sua influência nos resultados dos ensaios biomédicos:

Tabela 3: Análise de Descritores e levantamento bibliográfico final dos manuscritos

Palavras-chave	Base de Dados	Nº de Manuscritos
<i>Bem-Estar AND Camundongo AND Neurotransmissor</i>	LILACS	2
<i>Bem-Estar AND Camundongo AND Estresse;</i>	LILACS	2
<i>Bem-Estar AND Camundongo AND Dor</i>	LILACS	1
<i>Bem-Estar AND Camundongo AND Corticosterona</i>	LILACS	2
<i>Bem-Estar AND Camundongo AND ACTH</i>	LILACS	1
<i>Welfare AND Mouse AND Neurotransmitter</i>	PubMed	109
<i>Welfare AND Mouse AND Stress</i>	PubMed	198
<i>Welfare AND Mouse AND Pain</i>	PubMed	133
<i>Welfare AND Mouse AND Corticosterone</i>	PubMed	58
<i>Welfare AND Mouse AND ACTH</i>	PubMed	2
<i>Welfare AND Mouse AND Distress</i>	PubMed	58
<i>Welfare AND Mouse AND CRF</i>	PubMed	3

7.2. Levantamento Bibliográfico

De acordo com a análise de Descritores e o esquematizado levantamento bibliográfico aplicado pela presente metodologia, é possível afirmar que 569 manuscritos indexados foram

avaliados e estavam relacionados ao comprometimento do BEA, sendo analisados qualitativamente neste trabalho. Na análise dos respectivos manuscritos, apenas 10 a 15% do total de manuscritos (60 a 90 trabalhos) apresentaram alguma relação entre o BEA de camundongos em biotério e a qualidade dos resultados biomédicos. Sendo que na maioria dos trabalhos as palavras-chave Welfare AND Mouse AND Stress foram as que forneceram melhores informações, com dados científicos capazes de resumir o impacto do comprometimento do BEA na reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

Após a leitura dos manuscritos a partir do levantamento bibliográfico foram compiladas as informações a seguir.

a) Condições Ambientais: (Temperatura, luz e umidade)

Fatores ambientais desempenham um papel significativo no BEA. Os regulamentos e diretrizes recomendam que possíveis fatores estressores, como iluminação, odores e ruídos sejam eliminados ou reduzidos para maximizar o BEA. Embora as condições de alojamento dos animais sejam altamente controladas e padronizadas entre os diferentes laboratórios, ainda existem muitas sutis discrepâncias, como pequenas oscilações de temperatura que influenciam inevitavelmente os indivíduos e, conseqüentemente, a reprodutibilidade de ensaios entre laboratórios. (SPANGENBERG; KEELING, 2015; LANGGARTNER et al., 2017; HAAG; WELLS; LAMBERSON, 2018).

b) Manejo

O intervalo entre a trocas das gaiolas é outro fator que pode afetar o BEA. A frequência da limpeza das gaiolas proporciona benefícios potenciais ao BEA, como a adaptação dos animais ao manuseio, o que leva a facilidade de manejo e reduz potencialmente o estresse animal durante as manipulações experimentais e de criação. Proporciona, ainda, oportunidade para uma inspeção cuidadosa dos animais, permitindo que doenças e lesões sejam descobertas, além de contribuir para a escolha do tempo correto da finalização humanitária.

Por fim, um importante ponto a ser considerado é a familiaridade do animal ao procedimento e ao manipulador. No entanto, como camundongos usam urina para sinalizar dominância e delimitar territórios, a remoção de marcos olfatórios pode resultar em um aumento da agressividade. Estudos demonstram que, em longo prazo, a limpeza muito

frequente também pode causar estresse crônico em camundongos, reduzir o ganho de peso e aumentar a mortalidade infantil. (BURN et al, 2006; NOVAK et al., 2015)

Outro fator importante durante as trocas das gaiolas é a forma de se manejar os animais. O manuseio suave, consistente e manual se torna mais simples para o operador e menos estressante para os animais em suas atividades cotidianas, como a realização de testes clínicos, coleta de dados biológicos, administração de substâncias, além de uma melhor interação entre os roedores e os manipuladores. Isto promove a notória redução da carga de trabalho destes, com a demonstração de menor ansiedade, o que promove o aprimoramento geral do BEA e, por conseguinte, a diminuição da variação de dados nos ensaios experimentais (NAKAMURA; SUZUKI, 2018; NEELY et al., 2018).

c) Insumos e Materiais

O tipo de cama/piso usado é um componente fundamental do ambiente de roedores e tem impacto no BEA em laboratório. A preocupação mais comum decorrente de gaiolas sujas é o nível de amônia, proveniente da urina dos animais, pois os indivíduos permanecem com as narinas muito próximas a cama/piso, ficam altamente expostos à amônia durante 24 h por dia, todos os dias, e os níveis de amônia na gaiola tendem a ser muito mais altos do que os da própria sala. Problemas adicionais ocasionados por gaiolas de roedores sujas também podem ocorrer devido a altos níveis de dióxido de carbono, acúmulo de microrganismos nocivos e de alérgenos de proteínas urinárias de roedores que poderiam prejudicar, inclusive, os manipuladores. Em roedores (como em humanos) a exposição alta ou prolongada à amônia pode causar danos respiratórios e oculares e, potencialmente, danificar a pele em contato prolongado com materiais de piso/cama sujos (BURN et al, 2006; YILDIRIM et al., 2017).

A qualidade de um material de cama/piso está intimamente relacionada ao seu teor de umidade e a fatores como os efeitos microbianos, traumáticos e de aeração de seus componentes. Lascas de madeira têm sido recentemente preferidas como o material de cama para animais de laboratório devido ao seu baixo custo. No entanto, outros materiais para piso/cama que não contém poeira, que reduzem a propagação de alérgenos e produzem níveis insignificantes de amônia dentro da gaiola estão disponíveis no mercado. Porém, apesar das vantagens desses materiais, estes nem sempre são financeiramente acessíveis e/ou considerados confortáveis para camundongos, além de não obterem nenhum efeito na geração de amônia, somente diferindo na absorção de urina. Além da importância do material usado para piso/cama dos roedores, o volume do material colocado como piso/cama também é um

importante fator a ser observado, já que os roedores o utilizam para a construção de ninhos (BURN et al, 2006; ROSENBAUM; VANDEWOUDE; JOHNSON, 2009).

Quanto à alteração na temperatura, a atmosfera do ambiente tem um efeito maior sobre a temperatura da gaiola do que a quantidade de material de cama presente. Outros fatores que podem alterar a temperatura são o tipo de cama, o tamanho o número da população e a linhagem dos animais (BURN et al, 2006; ROSENBAUM; VANDEWOUDE; JOHNSON, 2009)

Fatores como comida e água ingeridos também podem afetar o BEA. Segundo Langgartner et al. (2017) animais que recebem água potável acidificada apresentam menor peso absoluto do timo e aumento do peso absoluto da adrenal; ambos representando consequências fisiológicas conhecidas da exposição ao estresse crônico.

Adicionalmente, há diferenças nos processos imunológicos entre esses animais em comparação com os camundongos que recebem água potável comum. Os parâmetros de alimentação (duração, tempo e quantidade de alimentos) ofertada aos camundongos tem potencial de modificar seu comportamento e fisiologia. Enquanto a disponibilidade de alimentos, inclusive, impulsiona mudanças sazonais na taxa metabólica de repouso dos roedores, a privação de alimentos pode aumentar a produção de hormônio regulador do ferro hepcidina em camundongos, hormônio esse importante na regulação da homeostase do ferro. Uma produção inapropriadamente baixa de hepcidina leva à carga de ferro tecidual e a privação de alimento poderia ter benefício clínico nas condições de carga de ferro. Atualmente os tratamentos para pacientes com essa condição são insuficientes, pois não abordam a causa subjacente do distúrbio (LANGGARTNER et al., 2017; MIRCIOV et al., 2018).

Segundo De Souza et al (2018), a ingestão crônica de água contendo poluentes (mesmo em pequenas concentrações consideradas ambientalmente relevantes) poderia levar à mudanças nas respostas imunológicas dos camundongos C57Bl/6J. Estudos como este registraram déficit responsivo dos camundongos diante o estímulo predatório que podem afetar a aptidão das presas e a dinâmica populacional (LANGGARTNER et al., 2017; DE SOUZA et al., 2018; GOLTSTEIN et al., 2018; RIMBACH et al., 2018).

7.2.1. Intersecção na relação BEA & Comprometimento dos resultados científicos

Através da correlação da palavra-chave “Raiz” *Animal Welfare* com os qualificadores sugeridos pelo DeCS e toda associação de termos foi possível identificar, durante o levantamento bibliográfico diversos fatores influenciados de alguma forma pelo BEA e que comprometem os resultados obtidos durante ensaios biomédicos (Tabela 4):

a) **Estresse:** O estresse agudo pode regular a resposta imune do hospedeiro por meio de interações entre o sistema neuroendócrino, principalmente pela liberação de neurotransmissores e o sistema imunológico. A noradrenalina (NE) é uma das catecolaminas do sistema nervoso simpático, liberadas durante condições estressantes. A NE liga-se e estimula o receptor beta2 adrenérgico (β_2 Adr), que modula as respostas imunes (humoral e celular), incluindo a alteração da produção de citocinas, proliferação de linfócitos e secreção de anticorpos. A exposição a estressores em modelos animais, incluindo camundongos, resultam em mudanças nas respostas imunes. O estresse crônico influencia principalmente o sistema endócrino pela liberação de corticosterona e induz em camundongos o aumento significativo da produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas 1B e 6 (IL-1B e 6) e TNF (KONSTANDI et al., 2000; HALLER et al., 2002; GILMORE; BILLING; EINSTEIN, 2008).

Deste modo a relação entre o sistema endócrino e a resposta imune (inata e adaptativa) demonstra o potencial de aumentar a gravidade de infecções em camundongos. Evidências na literatura mostram que, dependendo da duração (agudo ou crônico) e do momento, fatores estressores decorrentes de condições ambientais inadequadas como a temperatura (principalmente oscilações entre altas e baixas temperaturas), umidade (extremos entre ambiente úmido ou seco), direção e número de trocas do fluxo de ar têm efeitos imunossupressores que levam à diminuição da resistência do organismo à infecção ou a ativação da resposta imune. A exposição de camundongos à água em baixas temperaturas, como componente de um desenho experimental, altera fortemente a modulação da resposta imune, e também altera a fertilidade das fêmeas pela infecção genital por *Chlamydia muridarum* (SPANGENBERG; KEELING, 2015; BELAY; WOART; GRAFFEO, 2017).

b) Dor: A presença de dor afeta profundamente a biologia de todos os animais. Ainda não existem métodos alternativos para modelos experimentais de indução de dor e desconforto em camundongos, como é o caso dos estudos *in vivo* relativos à infecção intracraniana na meningite experimental. Deve-se ressaltar que existe uma relação entre a presença da dor e a utilização de fármacos que controlam a dor, como anestésicos e analgésicos, pois podem interferir nos dados experimentais e afetar os resultados da pesquisa, introduzindo uma variabilidade indesejada nestes. Existe também uma relação entre a interferência dos efeitos da dor não tratada nos resultados dos ensaios. Foram observados escores de dor fortemente reduzidos em camundongos submetidos a modelos de meningite e pancreatite aguda que receberam analgésicos; porém, sem alteração do curso clínico e histopatológico da doença nesses camundongos. Portanto, a busca por novos desenhos experimentais na CAL e o uso de protocolos analgésicos para reduzir a dor e melhorar o bem-estar destes animais é altamente justificado em camundongos (ou qualquer outro modelo animal) submetidos a procedimentos dolorosos como estes. A possível interferência nos resultados deve ser testada e utilizada de forma controlada, em especial quando avaliada estatisticamente. (SARAH MUNDT; MARCUS GROETTRUP; MICHAEL BASLER, 2015; CARBONE; AUSTIN, 2016).

c) Corticosterona: Estudos que avaliam os efeitos de diferentes fatores estressores, tanto agudos como crônicos, sobre a fisiologia do animal e se os efeitos sobre o comportamento são acompanhados por alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona, demonstram que este hormônio tende a aumentar em animais expostos a situações de estresse. Estudos em ratos, camundongos e também em seres humanos demonstram que a resposta à exposição aguda (de segundos a algumas horas) a fatores estressores como a imobilização, choques elétricos, baixas temperaturas, alteração olfatória, exercício prolongado, restrição alimentar, ou em situações semelhantes às que causam ansiedade em humanos é caracterizada por um aumento do CRH, ACTH, endorfinas e corticosterona (em roedores) ou cortisol (em humanos). Os estudos sobre os mecanismos da resposta biológica a estímulos estressores demonstraram que a resposta da corticosterona foi semelhante e significativamente superior em todos os grupos estressados em relação ao grupo controle não estressado. Ademais, a literatura demonstra que há, naturalmente, um aumento dos níveis de corticosterona em roedores machos após o comportamento sexual. Assim, é possível que o aumento da corticosterona observado possa ser devido ao comportamento sexual, e não somente a fatores estressores presentes durante ensaios científicos. Portanto, é de extrema importância que haja profundo conhecimento

quanto à biologia da espécie animal que se está utilizando para que haja correta avaliação do comprometimento do BEA e sua relação com os níveis séricos/plasmáticos de corticosterona (GÄRTNER et al, 1980; RETANA-MÁRQUEZ et al., 2003; JACOBSEN et al., 2013).

d) Neurotransmissores: A exposição a fatores estressores endógenos ou exógenos desencadeia uma cascata coordenada de respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais, visando à manutenção do equilíbrio homeostático do organismo. Estes podem ser prejudiciais em longo prazo, pois um organismo sob a influência do estresse crônico torna-se menos capaz de se defender contra células infecciosas, cancerígenas e outros fatores de doença. Por outro lado, mostram-se benéficos em curto prazo, protegendo o organismo de ameaças imediatas, e mantendo sua homeostase mesmo sob constante desafio ou ameaça total por forças intrínsecas ou extrínsecas ou por estressores físicos e/ou emocionais. Os dois componentes principais da resposta adaptativa geral são o CRH e o locus coeruleus- noradrenaline (LC-NA) do sistema nervoso autônomo simpático. Os níveis plasmáticos de corticosterona aumentam durante situações de estresse, o que leva também ao aumento dos níveis de neurotransmissores de monoaminas, como, por exemplo, diidroxifenilalanina (DOPA), dopamina (DA), norepinefrina (NE) e epinefrina (EP) cerebrais, que desempenham papéis importantes como neuromoduladores associados a numerosos estímulos estressantes. (HALLER; MIRONOV; RICHTER, 2001; LEE et al., 2012)

Experimentos de comportamento demonstraram que camundongos respondem, a princípio, ao estresse através da diminuição de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) no *locus coeruleus*² em comparação com controles não estressados. Também foi observado que, quando expostos a estresse, os camundongos apresentam a atividade dopaminérgica, avaliada pela expressão elevada de DA no hipotálamo e suprimida na amígdala, enquanto que a expressão de serotonina (5-HT) se apresenta elevada, e os níveis de Noradrenalina (NA) são suprimidos no córtex dorsal de camundongos. O aumento da atividade dopaminérgica no hipotálamo pode resultar em alterações no estado hormonal dos animais estressados, uma vez que vários hormônios, como ACTH, TSH, prolactina e hormônio de crescimento, estão sob controle dopaminérgico que também irão variar devido a situação de estresse e comprometimento do BEA. (KONSTANDI et al., 2000; REIS-SILVA et al., 2019).

² *Locus coeruleus* é um importante núcleo do tronco encefálico que modula vários processos fisiológicos e comportamentais, além de estar envolvido em vários distúrbios fisiopatológicos (KONSTANDI et al., 2000).

Tabela 4: Resumo do levantamento bibliográfico relacionando os fatores estressores, o comprometimento do BEA e a interferência nos resultados dos ensaios biomédicos

INFLUÊNCIA NOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS			
Condições/Materiais	Fatores Estressores	Alterações nos sistemas biológicos	Referências
<i>Condições Ambientais</i>	Temperatura	Ambientes com temperatura diferente da ideal para a espécie ou oscilação de temperatura causam estresse e consequentes alterações imunológicas com intensificação de possíveis infecções secundárias.	Neuroendócrino Imunológico <i>Fischer et al, 2018</i> <i>Iwaniec et al, 2016</i> <i>Liao et al, 2017</i> <i>Belay et al, 2017</i>
	Luz	Ciclo claro/escuro irregular causa estresse e consequentes alterações imunológicas, e comportamentais. A intensidade inadequada de luz pode causar danos aos olhos dos animais e agressividade.	Neuroendócrino Imunológico Oftalmológico <i>BRASIL, 2013</i> <i>Langgartner et al, 2017</i>
	Umidade	Ambientes muito secos provocam problemas respiratórios, ressecamento de mucosas e pele e o surgimento de feridas nos animais, enquanto que a umidade muito alta pode causar problemas respiratórios.	Imunológico Patológico <i>Brasil, 2013</i> <i>Phillips; Saxon; Quimby, 1950</i> <i>Katagiri et al., 2003</i> <i>Rosenbaum et al., 2010</i>
<i>Caixa/Piso</i>		O material para forração de gaiolas quando inadequado ou em volume errado proporciona baixa absorção de líquidos e acúmulo de amônia, que em contato direto com os animais causa lesões, dermatites de contato, e infecção microbiológica.	Imunológico (Alergia e Infecção) <i>Charlotte et al, 2006</i> <i>Reiter et al, 2017</i> <i>Rosenbaum et al, 2009</i>
<i>Alimentação</i>	Água	Água potável acidificada causa aumento de resposta inflamatória. Água contendo poluentes altera a resposta dos animais ao estímulo de risco.	Imunológico Neurológico <i>Acosta-Rodríguez et al, 2017</i> <i>Cintoli et al, 2018</i> <i>Bin et al., 2017</i> <i>JI et al., 2017</i>

	Ração	A disponibilidade de alimentos altera a taxa metabólica de repouso dos animais. A privação de alimentos altera a expressão de genes hepáticos e distúrbios endócrinos.	Neurológico Endócrino Gastrointestinal	<i>Goltstein et al, 2018</i> <i>De Souza et al, 2018</i>
	<i>População</i>	Disponibilidade de espaço insuficiente em relação ao tamanho do grupo de animais alojados na gaiola.	Nutrição Neuroendócrino	<i>Oliveira, 2012</i> <i>Oliveira, 2014</i> <i>Bailoo et al, 2018</i>
	<i>Comportamento</i>	Agressividade com operadores impedindo realização adequada de procedimentos cotidianos de criação e experimentação, com consequente aumento de estresse do animal e carga de trabalho do manipulador.	Neurológico	<i>Hamilton et al, 2014</i> <i>Lapchik et al., 2017</i>
	<i>Manejo</i>	Falta de habitualidade dos manipuladores com os procedimentos proporcionam um manejo ineficaz. As trocas de gaiola habitua os animais com o manuseio, diminuindo o estresse, o comportamento depressivo, e permitem inspeção frequente dos animais para observação de lesões e ou irregularidades. Contudo a retirada de marcos olfatórios aumenta os níveis de agressão, estresse crônico e diminui o ganho de peso.	Neurológico Neuroendócrino Endócrino	<i>Novak et al, 2015</i> <i>Charlotte et al, 2006</i> <i>Rosenbaum et al, 2009</i>
	<i>Enriquecimento Ambiental</i>	Ausência de mecanismos para Enriquecimento Ambiental (EA). Uso de EA inadequado à espécie ou sem EA. sem esquema de rotatividade.	Neurológico	<i>Gonçalves et al, 2010</i> <i>Medina, 2011</i> <i>Martins et al, 2017</i>

Fonte: Elaboração própria.

7.2.2. Avaliação e uso de testes para minimizar o comprometimento do BEA em conformidade com as sugestões das RNs do CONCEA

Durante a extensa revisão de literatura realizada por ocasião da construção desta dissertação foram identificados fatores que atuam como causas do comprometimento do BEA, incluindo as condições ambientais, o manejo e o enriquecimento ambiental. Estes fatores já são amplamente normatizados por legislação vigente como nas Resoluções Normativas (RNs) do CONCEA.

Segundo a RN Nº 33 do CONCEA (BRASIL, 2016b), “como regra geral, a forração deve ser macia, absorvente, atóxica e inodora. Recomenda-se a esterilização da forração, seja por autoclavação, seja por irradiação”. Nota-se que não há a citação de nenhum material específico, fazendo com que mais de um possa ser considerado. Havendo variedade de materiais que atendem à legislação, é possível, e recomendável, observar a preferência dos animais entre eles.

Nosso grupo de pesquisa há alguns anos desenvolveu o Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI), com o objetivo de avaliar a preferência dos camundongos SW-M, em várias idades, para diversas propostas descritas na DBCA e nas Resoluções Normativas do CONCEA para promover o BEA durante a rotina de um Biotério de Experimentação (KUZEL et al., 2013).

Portanto, o que pode ser julgado como um detalhe, a equipe técnica considera de extrema importância avaliar, ou ainda, “perguntar” ao animal qual é a sua preferência dentro das condições oferecidas nos biotérios deste grupo.

Os resultados dessa pergunta, ou seja, a demonstração da preferência do modelo utilizado seria o ponto de partida para a aplicação do BEA, pois, como observado nos estudos utilizando o SGI, o animal tendo escolha, irá buscar o material, insumo, equipamento no qual melhor se adapta em sua rotina e o mais importante, melhor lhe proporciona conforto. Sendo assim, é possível inferir que essa preferência do animal, intrinsecamente já seja uma informação inquestionável sobre como proporcionar o BEA e elevar a qualidade dos resultados obtidos nos ensaios científicos. Torna-se possível propor, dentro das sugestões descritas na DBCA e nas respectivas RNs do CONCEA, a preferência dos animais para o seu próprio uso durante a sua permanência no biotério para o desenvolvimento dos projetos científicos (Tabela 5) (KUZEL et al., 2013; MARTINS et al., 2017).

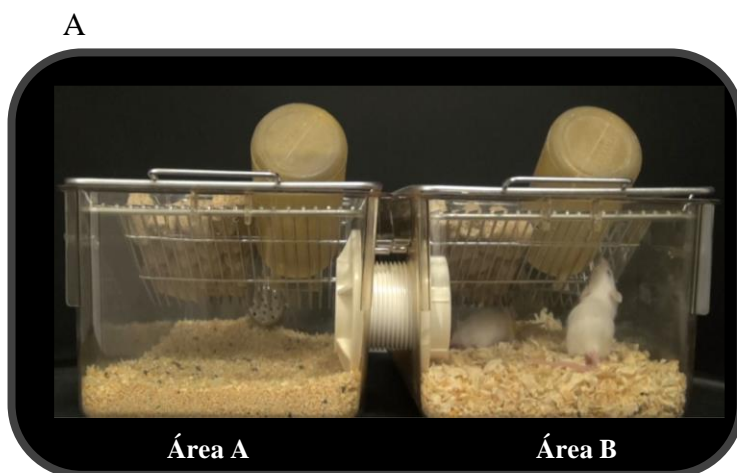
Através da ilustração por dados do exemplo de alguns tópicos abordados, como: piso/cama, método de higienização da água, ração (tipo de ração e esterilização) e

EA será sugerido que o BEA está intimamente ligado à possibilidade da escolha do animal e que, como usuários destes animais e, em cumprimento à legislação nacional e aos princípios éticos, deve-se motivar a atitude de testar o tipo de material, insumo e equipamento pelo qual é possível oferecer ao animal na busca do seu bem-estar, antes de realizar qualquer mudança em seu ambiente ou no seu manejo.

7.2.3. Piso/Cama

Em relação ao tipo do piso/cama que oferece maior BEA aos camundongos, houve comparação entre maravalha e Flocos de Pinus (FP) (Fig. 11). Apesar de existirem vantagens e desvantagens na utilização de ambos os materiais e de outros testados, quando aplicado o SGI em camundongos SW-M de várias faixas etárias, constatou-se a predileção pela maravalha. Logo, interpreta-se esta como capaz de oferecer maior BEA aos indivíduos. Neste estudo, infantes (4^a sdv), jovens (6^a sdv) e adultos (8^a sdv) distribuídos em grupos de 5 animais ao SGI durante duas semanas, receberam esses materiais no SGI (Fig. 11A), observando-se a sua incidência na área com FP (Área A) e com maravalha (Área B) pela manhã (10 h) e ao final da tarde (16 h). Os resultados demonstraram que a incidência dos animais que estavam localizados na área de maravalha foi superior a 90% (Fig. 11B) (MARTINS et al., 2017).

Figura 11: Uso do SGI para determinar a preferência dos camundongos ao piso/cama. O Sistema de Gaiolas Interligadas possibilitou oferecer a um grupo de camundongos a demonstrar sua preferência, ou expressar o seu bem-estar, apenas colocando na Área A - Flocos de Pinus e na Área B - a maravalha (A). Mensurando a incidência da presença dos indivíduos nas áreas do SGI, foi possível observar (B) que em todas as idades, a maravalha demonstrou uma incidência quase que total, sendo que alguns animais frequentavam a Área A para se alimentar ou excretar, sendo seu repouso realizado na Área B.



B

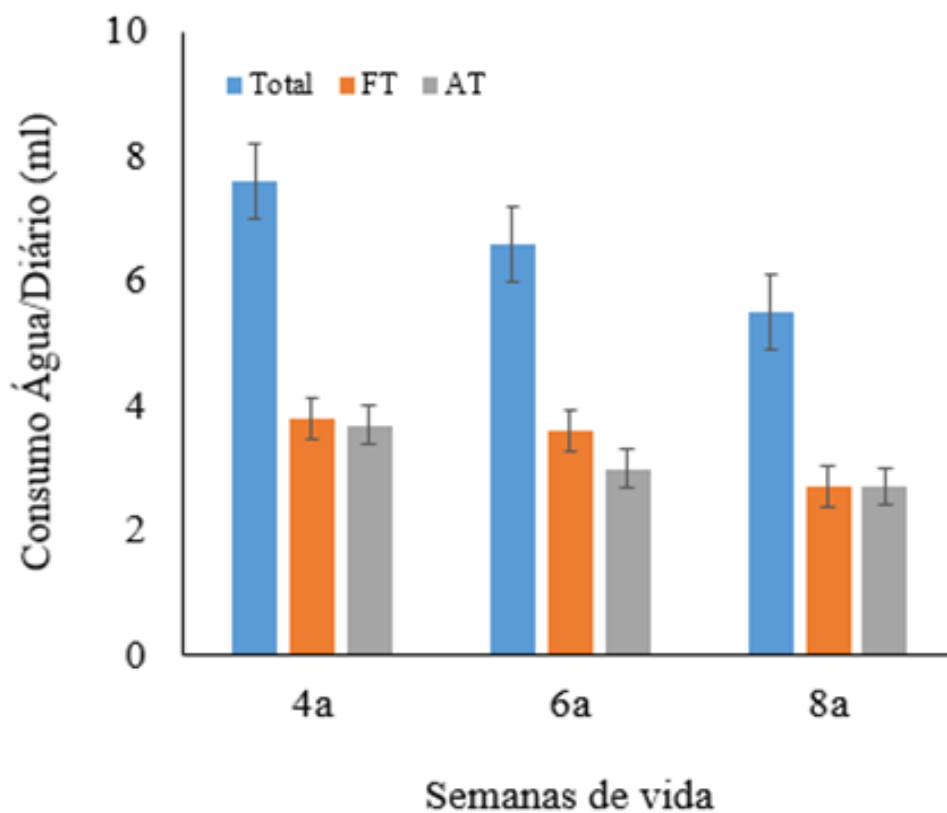
Idade	Área A	Área B
	<i>FP</i>	<i>Maravalha</i>
4 ^a sdv	0	100%
6 ^a sdv	0	100%
8 ^a sdv	8%	92%

Fonte: Imagem cedida por Miguel Brück

7.2.4. Alimentação

Através do desenho experimental utilizando o SGI, porém com abordagens diferentes, foi mantido o piso/cama de maravalha nas duas áreas; contudo, em um ensaio foi colocado na Área A uma mamadeira de 250 ml com água, que recebeu tratamento por filtração e na Área B uma mamadeira de 250 ml, que recebeu tratamento por autoclavação. Estimou-se o consumo diário (num período de duas semanas) de ambos processamentos da água e os resultados demonstram que, apesar dos animais na faixa de infantes a adultos diminuírem o consumo total de água (Total) estes não demonstram preferência entre os tipos de processamento, ou seja, o seu BEA não está comprometido com a oferta de água filtrada (FT) ou autoclavada (AT) (Figura 12) (MARTINS et al., 2017).

Figura 12: Comparação do consumo de água entre os diferentes tipos de processamento.

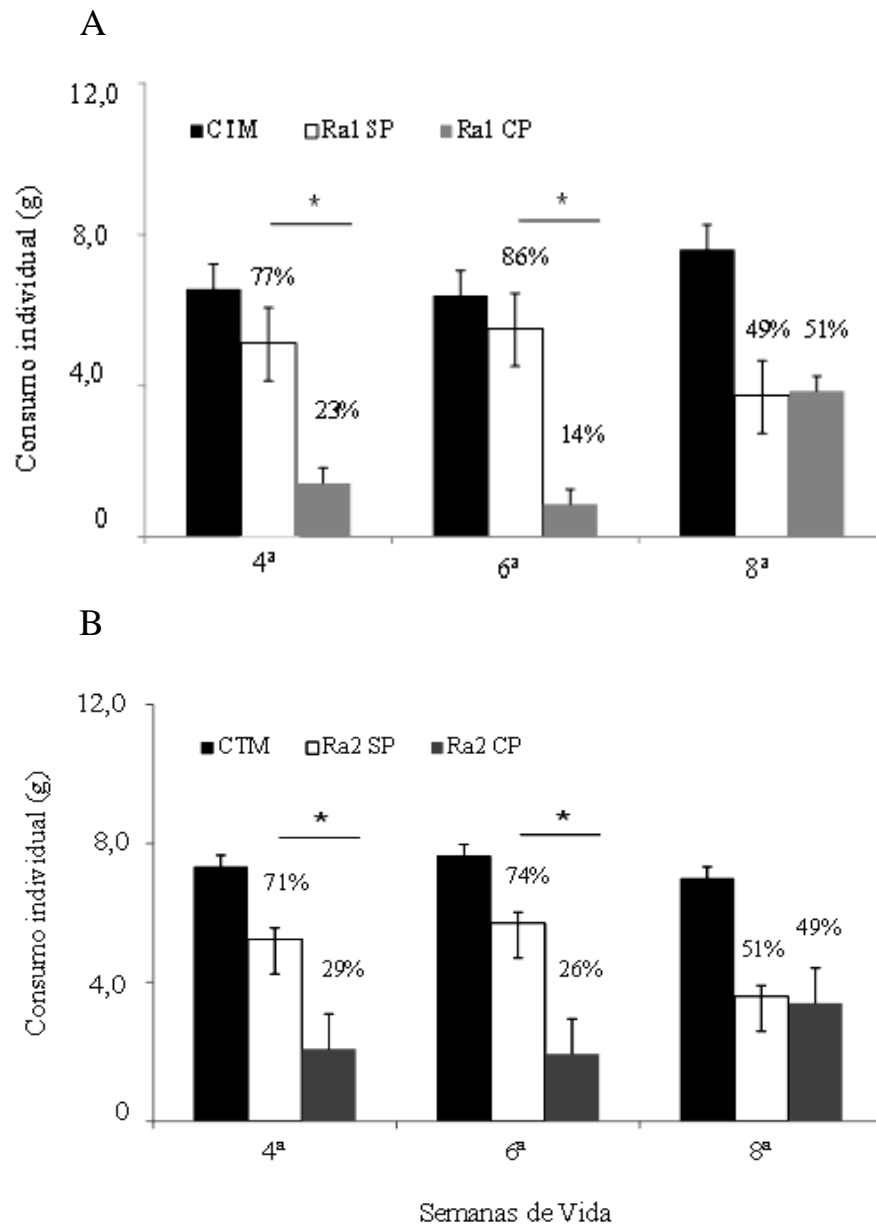


Fonte: Elaboração própria.

No que se refere ao consumo de ração comercial para roedores, foram realizadas três tipos de avaliação nos camundongos: i) Curva ponderal, ganho de peso em gramas através do consumo de ração peletizada em camundongos (autoclavada e não autoclavada) entre a 3ª e a 8ª sdv; ii) Percentual do consumo total médio em gramas (CTM) de dois tipos de ração peletizadas de fabricantes diferentes (R1 e R2) e iii) Percentual do consumo total médio em gramas (CTM) de ração peletizada e extrusada após autoclavação (MARTINS et al., 2017).

Os principais resultados observados demonstraram que o ganho de peso não apresentou diferença quando relacionado ao consumo de ração autoclavada e não autoclavada em nenhuma das idades estudadas (dados não mostrados). No entanto, quando avaliadas a preferência dos camundongos em relação ao processo de esterilização (Fig. 13), foi evidenciado que para ambos os tipos de ração (R1 e R2) os animais preferem consumir a ração pela qual não passou pelo processo de autoclavação, exceto os animais adultos (8ª sdv) que não demonstraram preferência, consumindo quantidade percentual similar tanto da ração autoclavada quanto da não autoclavada para a ração R1 (Fig. 13A) quanto para a ração R2 (Fig. 13B). Interessantemente, quando houve comparação do consumo da ração peletizada em relação à ração extrusada, foi observado que somente na 6ª sdv, quando os animais são jovens, houve uma significativa preferência pela ração extrusada, porém apresentam um CTM mais elevado quando comparado com a ração peletizada (MARTINS et al., 2017).

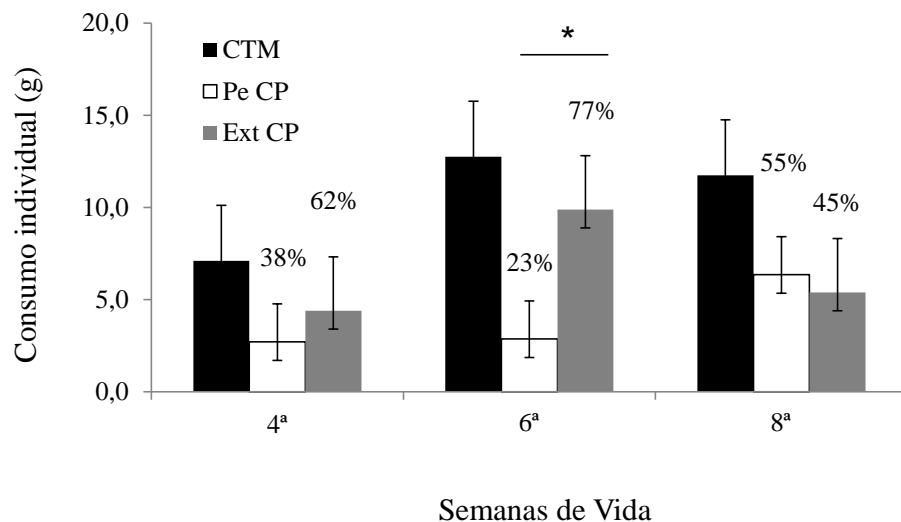
Figura 13: Comparação entre dois tipos de ração e diferentes processamentos. Ofertou-se aos animais a R1 (A) e a R2 (B) e foi avaliado o consumo total (Barra Preta), Ração não autoclavada (Barra Branca – SP) e Ração autoclavada (Barra cinza – CP). O asterisco demonstra a significância estatística ($p \leq 0,05$) entre a SP e CP.



Fonte: Elaboração própria.

Por fim, quando comparados o consumo de ração entre a ração peletizada e a extrusada, ambas autoclavadas, os resultados demonstraram que na idade jovem o consumo da extrusada foi superior à peletizada. Nas demais idades, tanto os jovens quanto os adultos apresentaram consumo semelhante entre os dois tipos de ração (Fig. 14) (MARTINS et al., 2017).

Figura 14: Teste comparativo entre o consumo de ração peletizada e extrusada. Na 8ª sdv o consumo total (Barra Preta – CTM) foi superior às demais idades. A preferência nessa idade foi maior pela forma extrusada (Barra cinza – Ext CP) do que pela peletizada (Barra branca – Pe CP). O asterisco demonstra a significância estatística ($p \leq 0,05$) entre a Pe CP e Ext CP na 8ª sdv.



Fonte: Elaboração própria.

7.2.5. Enriquecimento ambiental

Uma das mais discutidas e importantes atividades de manejo que visam o BEA é o Programa de Enriquecimento Ambiental (PEA).

Em sua definição conceitual: “são materiais e equipamentos incluídos ao microambiente dos animais que proporcionem a possibilidade de exercer dentro da sua restrição de espaço a complexidade do seu repertório comportamental natural...”. Em relação aos camundongos, pouco se encontra na literatura sobre a descrição detalhada do seu “repertório de comportamento natural”. Dessa forma, esse fato se torna um complicador para a escolha do objeto, material e equipamento ideal para que o camundongo em biotério possa

utilizar satisfatoriamente o EA. Contudo, estudos preliminares sobre a avaliação da preferência pelo tipo de EA por camundongos Swiss Webster através do SGI, demonstrou que os tipos de EA preferidos pelos camundongos em suas diferentes idades são os relacionados à categoria de abrigo e nidificação, notadamente o Igloo® e o Papel Absorvente (MARTINS et al., 2017).

Tabela 5: Sugestões da aplicação de insumos e materiais conforme a RN N° 33 do CONCEA e a preferência dos camundongos

BEM-ESTAR		
ESTUDO COMPARATIVO		
TÓPICOS	RESOLUÇÃO NORMATIVA N° 33 (BRASIL, 2016 b)	PREFERÊNCIA
Piso/Cama	Deve evitar derrapagens e lesões nas patas dos animais; assoalhos não gradeados; forração macia, absorvente, atóxica, inodora, e esterilizada por autoclavação ou irradiação.	Maravalha Autoclavada
Água	Água potável, fresca e limpa, oferecida à vontade.	Água Filtrada ou Autoclavável
Ração	Ração peletizada esterilizada por autoclavação ou irradiação.	Peletizada e Irradiada
Enriquecimento Ambiental	Diversos materiais e equipamentos	<i>Igloo</i> [®] e Papel Absorvente

Fonte: Elaboração própria.

7.3. VIDEO ABSTRACT

A geração de um código QR permitiu compilar os resultados em forma de apresentação de slides, ou Video Abstract³ (Figura 16), buscando auxiliar na melhor compreensão dos resultados por parte dos membros da banca avaliadora e leitores interessados.

Contudo, conforme descrito nos objetivos, o Vídeo Abstract faz parte do produto gerado nessa tese que tem a intenção de demonstrar a importância do BEA na qualidade dos resultados científicos e promover uma nova “ferramenta” didática que seja capaz de relacionar a facilidade de acesso as informações, revisão dinâmica do conteúdo e formulação de um e- Book com acesso restrito, pertinente a um cadastro prévio de usuários interessados na Ciência de Animais de Laboratório.

Figura 16: Geração de um código QR, que através da câmera de um telefone celular, possibilita o acesso ao conteúdo da síntese de todas as informações contidas na respectiva dissertação e pode ser um protótipo de uma nova forma de divulgação científica.



³ O vídeo abstract está também disponível para visualização através do link https://drive.google.com/file/d/1N8m_IDMaN0FBXEMP4xnYa7n69Otdz_8x/view.

8. DISCUSSÃO

Através da análise de Descritores os resultados demonstraram que publicações no estudo do BEA em idiomas latinos, como português e espanhol, apresenta níveis muito inferiores quando comparado ao número de publicações em inglês. O sítio PubMed apresentou com a palavra-chave Welfare um número de manuscritos 84% maior quando comparado com a bases de dados LILACS e SciELO. Esse resultado merece ser discutido devido à escassez em relação ao restante do mundo quanto ao desenvolvimento da ciência e inovação tecnológica na área de CAL. Para mais demonstra que a aplicação do BEA entre os biotérios mundiais difere das condições nacionais, fato que pode trazer dificuldades na aplicação dos produtos, materiais e procedimentos para a realidade brasileira.

Todavia surpreendentemente foi possível observar que o subdesenvolvimento nos estudos da área de CAL, observado por meio da análise de Descritores realizada no presente estudo, afeta de forma semelhante os países considerados economicamente desenvolvidos, mesmo com alto investimento em ciência e tecnologia. Quando se comparou o descritor Welfare com a associação Welfare AND Laboratory Animals, somente 2,4% dos manuscritos estão relacionados ao estudo do BEA. Esse percentual ainda diminui quando se compara o uso do modelo camundongo com o estudo do seu BE. A palavra-chave Mouse apresentou no sítio PubMed aproximadamente 2 milhões de trabalhos, mas somente 2 mil estão relacionados ao estudo do seu BE, ou seja, apenas 0,5% do total de manuscritos respectivo ao mesmo modelo.

Os dados permitem uma reflexão de extrema importância: i) Há uma necessidade de maior investimento ou incremento na área da CAL, principalmente no tocante ao BEA, para que se aprimore os conhecimentos e que esses conhecimentos sejam aplicados dentro das condições nacionais, sem necessidade de adaptações e; ii) A falta de dados abre precedentes a interpretações e opiniões pessoais as quais o BEA pode ser “escolhido” pelos usuários de animais de laboratório através de poucos estudos e pela sua preferência (ou sua própria percepção de BE) e não por dados científicos comprovados. Um exemplo previamente citado é a questão da visível busca pela abolição do uso de dióxido de carbono para a eutanásia de pequenos roedores nos biotérios nacionais.

Vale enfatizar que há um grande movimento de interpretação da RN No 37 do CONCEA, que classifica o CO₂ como aceito com restrição, como inaceitável. Um recente documento da FELASA (Federação Europeia de Sociedades/Associações de Ciência de

Animais de Laboratório) afirma que nenhuma proibição ou interdição ao CO₂ deve ser estabelecida até que haja argumentos científicos sólidos sobre seu uso e alternativas relevantes. Sob o ponto de vista desses especialistas, nenhuma outra prática de eutanásia, até o presente momento, demonstrou resultados melhores que combinem preservação do BEA com a preservação do bem-estar ocupacional, segurança, aspectos práticos e limitações relacionadas ao estudo. O supracitado documento da FELASA ainda embasa o subdesenvolvimento na pesquisa da área de CAL ao sugerir que, em uma revisão sistemática de publicações relacionadas ao uso de CO₂ na eutanásia em camundongos, os resultados preliminares revelam que há muita pouca evidência científica apoiando sua proibição até o momento. Demonstra-se também a necessidade de aprofundar os estudos sobre os processos de uso do CO₂ visando maximizar sua eficiência e minimizar o desconforto do animal e do manipulador (FELASA, 2019).

Sobre o levantamento bibliográfico, ao final, o presente trabalho realizou uma seleção de 200 manuscritos relacionando o camundongo, o BEA e o descritor ESTRESSE nas respectivas bases de dados. O referido material se tornou a fonte principal de análise crítica e fonte de conhecimento para discutir como o comprometimento do BEA pode interferir nos resultados dos ensaios biomédicos. Cabe ressaltar que também foram analisados 134 manuscritos relacionados à Dor e 60 publicações acerca dos níveis de corticosterona. Muitos desses trabalhos não tinham como objetivo relacionar dados sobre interferência do BEA e sua influência nos resultados dos ensaios científicos, no entanto durante a leitura dessas publicações foi possível observar a presença da relação supracitada.

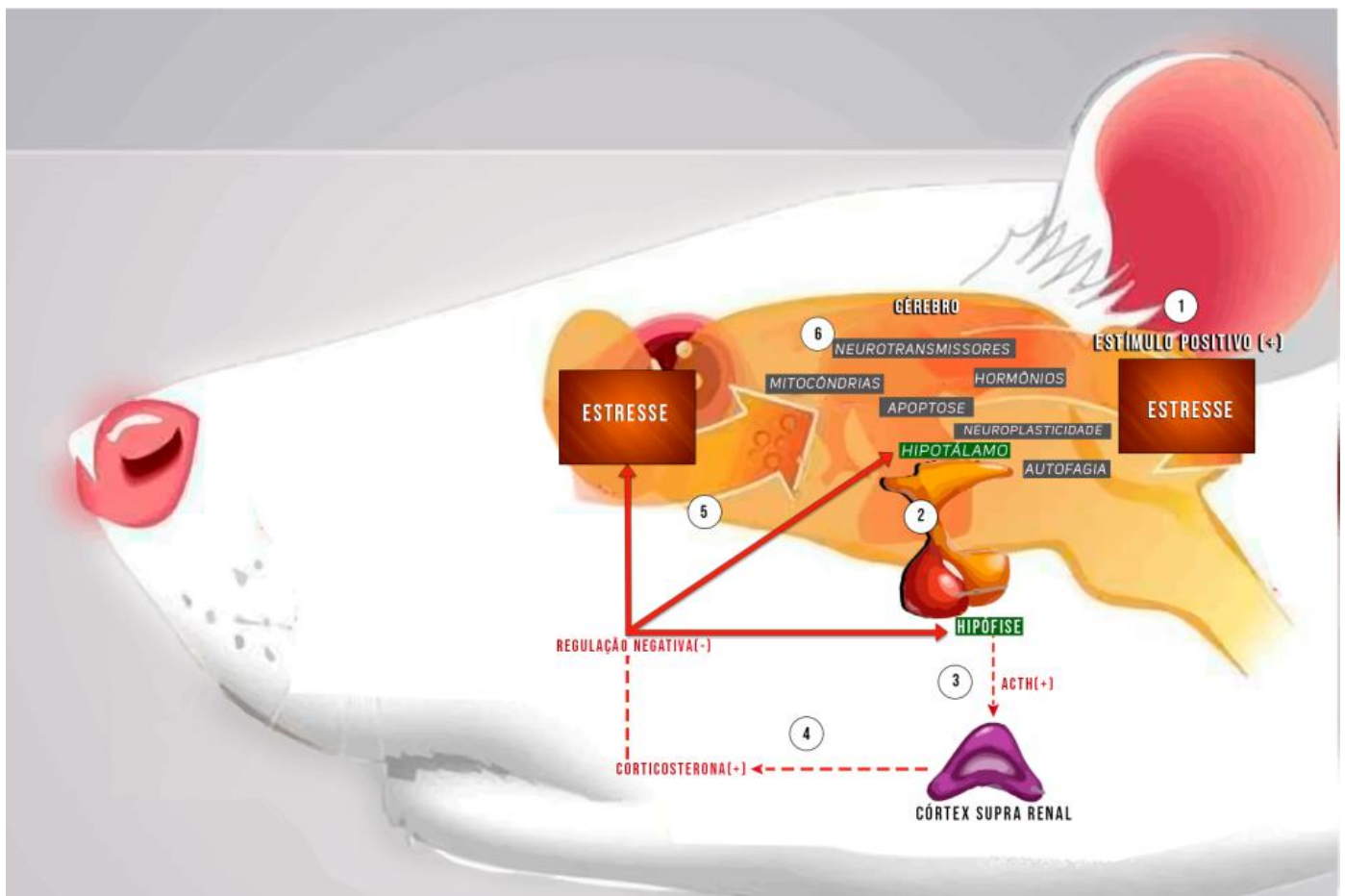
Intrinsecamente, o camundongo é um animal preparado para situações de estresse. Por ser um dos componentes da base de cadeia alimentar, seu organismo está em funcionamento fisiológico preparado para luta ou fuga, sobretudo para a fuga dos predadores. Isso fica evidenciado quando se observa o número de batimentos cardíacos entre 600 a 700 batimentos por minutos e a frequência respiratória em torno de 150 movimentos respiratórios por minuto. Assim, a questão se torna mais complexa, visto que naturalmente o profissional estaria trabalhando com um modelo “estressado” aliado ao fato de colocar esses animais em ambientes de restrição de espaço, o que minimiza muito a expressão do seu repertório comportamental natural (LAPCHICK et al., 2017).

Os camundongos adultos em biotério mantêm seu comportamento de territorialismo e estruturação hierárquica. Esses comportamentos estão diretamente envolvidos no reconhecimento espacial (exploração do ambiente e busca pelo alimento) e o reconhecimento

entre os indivíduos, principalmente pela ativação dos sistemas tácteis e olfatórios através do Sniffing e do Digging (KUZEL et al., 2013).

Para esclarecer essa questão, acredita-se que primeiramente é preciso entender o sistema de regulação do estresse, com a finalidade de minimizar o desconforto e o estresse desses indivíduos, já que seu organismo já está preparado para responder a fatores estressores. Fundamentando nos conhecimentos fisiológicos e neuroendócrinos o sistema de resposta ao estresse nos animais, de uma forma geral, funcionaria da seguinte maneira (Figura 15):

Figura 15: Regulação negativa de corticosterona. O camundongo, em resposta a fatores estressores, tem capacidade de se adaptar fisiologicamente a situação de estresse “disparando” um sistema de regulação dos níveis de corticosterona.



Fonte: Elaboração própria.

De modo geral, seguindo os pontos da figura 15, havendo um estímulo estressor (positivo) os camundongos apresentam elevação significativa do hormônio corticosterona (1). O hipotálamo, rapidamente, responde ao estímulo estressor liberando o CRH em seu eixo com a Hipófise (2). A Hipófise, por sua vez, libera o ACTH estimulando o Córtex da Suprarrenal

(3) e o Córtex da Suprarrenal, por sua vez libera corticosterona (4) na corrente sanguínea funcionando como um modulador da intensidade e permanência da resposta ao estímulo estressor (5) (OLIVEIRA et al., 2015, CAMPOS et al., 2016).

Resumidamente, o comprometimento de algum desses três pontos pode estar envolvido com: bloqueio da transcrição, liberação ou ligação do CRH aos seus receptores CRHR1 e CRHR2 apesar do estímulo estressor; bloqueio da liberação ou da ação do ACTH. Um dos principais fatores que estimulam a liberação de ACTH é a ação do CRH no eixo Hipotálamo-Hipófise. Havendo o comprometimento da liberação de CRH, não haveria liberação de ACTH. De outra forma, pode estar ocorrendo a liberação de ACTH, porém não ocorrer um correto estímulo do córtex da suprarrenal e por fim, há a hipótese de que a liberação de corticosterona pelo córtex da Suprarrenal não esteja ocorrendo de forma satisfatória (OLIVEIRA et al., 2015, CAMPOS et al., 2016).

Em conjunto essas três hipóteses demonstram um círculo vicioso, possibilitando averiguar que em um indivíduo que não apresenta o mecanismo de regulação negativa ao estímulo estressor (5), teoricamente, seria mantida ativada permanentemente a percepção de estresse pelo sistema neuroendócrino. Dessa forma, sugere-se que esses indivíduos não seriam capazes de se adaptar adequadamente à situação de estresse ou modular a intensidade dos fatores estressores. Nas atividades de rotina tal fato é constatado com as atitudes de agressividade exacerbada em camundongos SW-M quando reagrupados na idade adulta (OLIVEIRA et al., 2015, FRAGOSO et al., 2016).

Um importante ponto que deve ser relevado, após a análise dos trabalhos relacionados ao estresse é a elevação dos níveis de corticosterona. Conforme descrito na Figura 15 a elevação da corticosterona faz parte de um processo de adaptação ao fator estressor. A literatura demonstra que há, naturalmente, um aumento dos níveis de corticosterona em roedores machos após o comportamento sexual. Assim, é possível que o aumento da corticosterona observado possa ocorrer devido a algum comportamento natural, como o sexual, e não somente a fatores estressores presentes durante ensaios científicos. (GÄRTNER et al., 1980; JACOBSEN et al., 2013).

Portanto, afirma-se que relacionar a dosagem única de corticosterona após um determinado procedimento e sua elevação não se torna factível de afirmação do comprometimento do BEA. Torna-se necessário investigar marcadores preditivos e diagnósticos mais precisos para a afirmação do comprometimento do BEA ou que o indivíduo esteja sob estresse. Adicionalmente, considera-se que somente em duas situações os níveis de

corticosterona são fidedignos para o comprometimento do BEA: i) diminuição dos níveis de corticosterona ou não elevação desses níveis em situações de estresse e ii) permanência dos níveis elevados de corticosterona (OLIVEIRA et al., 2015, CAMPOS et al., 2016).

Então, para que não haja comprometimento do BEA e interferência nos resultados dos ensaios biomédicos (mesmo que os níveis de corticosterona estejam transitoriamente elevados), deve-se levar em conta:

- 1) Evolutivamente esses animais estão preparados fisiologicamente para situações de estresse, especialmente o sistema de luta e fuga. É importante manter uma rotina e condicionamento de manejo e procedimentos para não causar estresse prejudicial (distresse) ao animal;
- 2) Os camundongos possuem uma extrema capacidade de se adaptar a ambientes e condições adversas, desde que haja tempo para eles se adaptarem e manterem sua rotina;
- 3) O comportamento comensal com seres humanos é extremamente benéfico para o camundongo, notadamente no que diz respeito ao fornecimento de alimentos. Contudo, embora furtiva, a proximidade com o humano aumenta sua flexibilidade social.

É válido, então, ponderar a existência potencial em afirmar que o BEA desses animais se encontra intimamente ligado à relação com os seres humanos, pois foi uma forma que esses animais encontraram, dada a facilidade de acesso aos alimentos e sua capacidade de esconder e escapar de situações de risco, de se adaptarem e evoluírem.

É possível refletir que o BEA dos camundongos está muito mais ligado às suas próprias escolhas ou preferências do que quando se tenta relacionar o estado de bem-estar do ser humano com o desse animal. Não é viável comparar o estresse humano com o estresse do animal. O sofrimento e o desconforto desse animal, inicialmente, partem da restrição de espaço e da impossibilidade de se deslocarem ou buscarem um local de sua escolha (acreditamos mais estável e seguro). Portanto, deve-se procurar maneiras de elevar o BEA através da promoção e facilitação da sua adaptação seja o mais próximo possível de sua preferência, para a manutenção de uma rotina estável e contínua, pois a instabilidade, mudanças bruscas de rotina, de manipulador e de procedimentos irão ser considerados imediatamente pelos animais como um fator estressor e comprometimento do seu BE (DOS SANTOS et al., 2019).

9. CONCLUSÕES

No intuito de contribuir com o desenvolvimento científico e tecnológico da CAL e a promoção do BEA, as principais conclusões dessa dissertação foram:

- Existe uma urgente necessidade de incrementar, estudar e principalmente publicar manuscritos relacionados à elevação do BE do modelo camundongo;
- É preciso desenvolver a CAL de maneira a estruturar projetos que visem a inovação de materiais, produtos, processos e procedimentos que atendam às necessidades de centros de criação e experimentação no âmbito nacional, a fim de evitar adaptação de conhecimentos provenientes de outras realidades socioculturais e financeiras;
- O comprometimento do BEA afeta diretamente o sistema biológico do referido biomodelo, interferindo diretamente na confiabilidade e na reprodutibilidade dos ensaios biomédicos;
- A diminuição da confiabilidade/reprodutibilidade dos resultados científicos fecha um círculo vicioso, onde o comprometimento ético se inicia pela falha da aplicação e da manutenção do BEA, havendo conseqüente necessidade da repetição dos ensaios e da utilização de um maior número de animais, promovendo um desconforto permanente nesses animais em função da ineficiência dos resultados obtidos nos ensaios biomédicos;
- A estruturação do Círculo Virtuoso de *BEA & Qualidade Científica* se baseia no estudo e conhecimento do biomodelo utilizado, inicialmente do seu comportamento em habitat natural e em restrição de espaço nos biotérios. A partir disso, realizar projetos e ensaios capazes de testar, ou melhor, “perguntar” ao animal qual sua preferência em relação a estruturas e procedimentos básicos como: piso/cama, alimentação e EAI. Dessa forma, não inferir a partir de dados seletivos ou percepções pessoais, antropocentricamente, o que seria melhor para o BEA;
- A presença de fatores estressores no qual os animais não possuem a possibilidade de adaptação é um importante aspecto de comprometimento do BEA. São exemplos: o comprometimento da qualidade sanitária dos animais, mudanças abruptas da rotina de procedimentos e manipuladores, imposição de materiais e procedimentos que dificultam a

adaptação do animal, dentre outros. O impacto do estresse está diretamente evidenciado na confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados das pesquisas.

REFERÊNCIAS

ACOSTA-RODRÍGUEZ, V. A.; DE GROOT, M. H. M.; RIJO-FERREIRA, F.; GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S. Mice Under Caloric Restriction Self-Impose a Temporal Restriction of Food Intake as Revealed by an Automated Feeder System. *Cell metabolism*, v. 26, n. 1, p. 267- 277.e2, 5 jul. 2017.

ANDRADE, A.; PINTO S. C.; OLIVEIRA R. S., (org). *Animais de Laboratório – criação e experimentação*. p. 25-29, 263-275, 2002.

ANDROUTSOS, G.; KARAMANOU, M.; STEFANADIS, C. William Harvey (1578-1657): discoverer of blood circulation. *Hellenic journal of cardiology: HJC = Hellenike kardiologike epitheorese*, v. 53, n. 1, p. 6–9, fev. 2012.

APPLEBY, M. C.; HUGHES, B. O.; MENCH, J. A.; OLSSON, A. *Animal Welfare*, 2ª edição, Wallingford:Cabi, 2011.

BAILOO, J. D.; MURPHY, E.; VARHOLICK, J. A.; NOVAK, J.; PALME, R.; WÜRBEL, H. Evaluation of the effects of space allowance on measures of animal welfare in laboratory mice. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 713–713, 15 jan. 2018.

BALLS, M.; GOLDBERG, A. M.; FENTEM, J. H.; BROADHEAD, C. L.; BURCH, R. L.; FESTING, M. F. W.; FRAZIER, J. M.; HENDRIKSEN, C. F. M.; JENNINGS, M.; KAMP, M. D. O. van der; MORTON, D. B.; ROWAN, A. N.; RUSSELL, C.; RUSSELL, W. M. S.; SPIELMANN, H.; STEPHENS, M. L.; STOKES, W. S.; STRAUGHAN, D. W.; YAGER, J. D.; ZURLO, J.; ZUTPHEN, B. F. M. van. The three Rs: the way forward: the report and recommendations of ECVAM Workshop 11. *Alternatives to laboratory animals: ATLA*, v. 23, n. 6, p. 838–866, dez. 1995.

BATISTA, W. S.; SILVA, L. C. C. P.; DEMARQUE, K. C.; OLIVEIRA, F. S.; ACQUARONE, M.; BÔAS, F. V.; OLIVEIRA, G. M. Estudo comportamento agressivo de camundongos em biotério: aplicação do modelo espontâneo de agressividade (MEA). *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v. 1, n. 4, p. 322–335, 2012.

BAUMANS, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, v.46, n. 2, p. 162-70. 2005.

BELAY, T.; WOART, A.; GRAFFEO, V. Effect of cold water-induced stress on immune response, pathology and fertility in mice during *Chlamydia muridarum* genital infection. *Pathogens and Disease*, v. 75, n. 5, p. ftx045, jul. 2017.

BIN, P.; LIU, S.; CHEN, S.; ZENG, Z.; HUANG, R.; YIN, Y.; LIU, G. The effect of aspartate supplementation on the microbial composition and innate immunity on mice. *Amino Acids*, v. 49, n. 12, p. 2045–2051, 1 dez. 2017.

BINSFELD, P. C. Caminho para a Legalidade. In: LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M; KO, G.M. (Orgs.) Cuidados e manejos de animais de laboratório. 2. ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 2017. p. 11-24.

BRAGA, L. M. Os 3 Rs. In: Lapchik, V. B. V; Mattaraia, V. G. M; Ko, G. M. (Orgs.). Cuidados e manejos de animais de laboratório. 2. ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 2017. p. 35-45.

BRASIL. Decreto no 24.645/1934 de 10 de julho. Estabelece medidas de proteção aos animais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/d24645.htm>. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Decreto-Lei no 3.688/1941 de 03 de outubro. Lei das contravenções penais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del3688.htm>. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Lei no 5.197/1967a de 03 de janeiro. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L5197.htm >. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Decreto-Lei no 221/1967b de 28 de fevereiro. Dispõe sobre a proteção e estímulos à pesca e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del0221.htm > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Lei no 6.638/1979 de 08 de maio. Estabelece normas para a prática científica da vivissecção de animais e determina outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1970-1979/L6638.htm > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Constituição 1988 de 05 de outubro. Constituição da República Federativa do Brasil. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicaocompilado.htm > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Lei no 9.605/1998 de 12 de fevereiro. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9605.htm > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Decreto no 3.179/1999 de 21 de setembro. Dispõe sobre a especificação das sanções aplicáveis às condutas e atividades lesivas ao meio ambiente e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/d3179.htm > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Lei no 11.794/2008 de 08 de outubro. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 9 out. 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm>. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Decreto no 6.899/2009 de 15 de julho. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais-CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm > Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa nº 15, de 16 de dezembro de 2013. Baixa a Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 dez. 2013. Disponível em: < http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238343.pdf>. Acesso em 1 jul. 2019.

BRASIL (a). Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa no 30, de 02 de fevereiro de 2016a. Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 3 fev. 2016. Disponível em: < http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238684.pdf>. Acesso em 1 jul. 2016.

BRASIL (b). Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa no 33, de 18 de novembro de 2016b. Baixa o Capítulo "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 21 nov. 2016. Disponível em: < <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=5&data=21/11/2016>>. Acesso em 21 ago. 2017.

BROOM, D. M. Animal welfare defined in terms of attempts to cope with the environment. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A Animal Science*, v. Supplement 27, p. 22–28, 1 mar. 1996.

BROOM, D. M. A History of Animal Welfare Science. *Acta Biotheoretica*, v. 59, n. 2, p. 121–137, 1 jun. 2011.

BURN, C. C.; PETERS, A.; DAY, M. J.; MASON, G. J. Long-term effects of cage-cleaning frequency and bedding type on laboratory rat health, welfare, and handleability: a cross-laboratory study. *Laboratory Animals*, v. 40, n. 4, p. 353–370, 1 out. 2006.

CAMPOS, J. D. S.; DEMARQUE, K. C.; HOPPE, L. Y.; FRAGOSO, V. M. S.; MARTINS, T. V. A.; GONÇALVES, M. Â. B; OLIVEIRA G. M. O comportamento do camundongo swiss webster em biotério de experimentação: observações e reflexões. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v. 4, n. 1, p. 32–43, 2016.

CARBONE, L.; AUSTIN, J. Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare. *PloS one*, v. 11, n. 5, p. e0155001–e0155001, 12 maio 2016.

CARDOSO, C. Legislação brasileira para uso de animais em pesquisa. In LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M; KO, G.M. (Orgs.) *Cuidados e manejos de animais de laboratório*. São Paulo: Ateneu, 2009. p. 11-27.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28. n. 1, p. 11-23, 2007.

CHUMBINHO, L.C.; SILVA, L. C. C. P.; PIZZINI, C. C.; BATISTA, W. S.; OLIVEIRA, F. S.; OLIVEIRA, G. M. Etograma de camundongos em biotério: Quais são as principais atividades deste animal dentro da gaiola? *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 25-31, 2012.

CINTOLI, S.; CENNI, M. C.; PINTO, B.; MOREA, S.; SALE, A.; MAFFEI, L.; Berardi, N. Environmental Enrichment Induces Changes in Long-Term Memory for Social Transmission of Food Preference in Aged Mice through a Mechanism Associated with Epigenetic Processes. *Neural Plasticity*, v. 2018, p. 3725087, 2018.

CONCEA. Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, Brasília, DF, 26 set. 2016. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238343.pdf>. Acesso em 21 ago. 2019.

DA COSTA, S. M.; ROSSI, M. I. D.; EVAGELISTA, A. A.; OLIVEIRA, G. M. Origin, Phylogeny and Natural Behavior of Mice: What is Their Influence on Welfare During their Maintenance in the House Facilities? *Am J Biomed Sci & Res*. 2019 – 5 (5). 2019.

DANTAS, J. A.; AMBIEL, C. R.; CUMAN, R. K. N.; BARONI, S.; AMADO, C. A. B. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná - DOI: 10.4025/actascihealthsci.v28i2.1099. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v. 28, n. 2, p. 165–170, 13 mar. 2008.

DE SOUZA, J. M.; RABELO, L. M.; FARIA, D. B. G.; GUIMARÃES, A. T. B.; SILVA, W. A. M.; ROCHA, T. L.; ESTRELA, F. N.; CHAGAS T. Q.; MENDES B. O.; MALAFAIA, G. The intake of water containing a mix of pollutants at environmentally relevant concentrations leads to defensive response deficit in male C57Bl/6J mice. *Science of The Total Environment*, v. 628–629, p. 186–197, 1 jul. 2018.

EVANGELISTA, A. A.; COSTA, S. M.; ROSSI, M. I. D.; OLIVEIRA, G. M. Wild mouse & laboratory mouse historical aspects, genetic selection and welfare. *R. Soc. bras. Ci. Anim. Lab.*, p. 122–129, 2019.

FELASA. Position paper on the proposed ban of carbon dioxide for rodent euthanasia - Policy documents - Felasa | Federation for Laboratory Animal Science Associations. Disponível em: <<http://www.felasa.eu/policy-documents/position-paper-on-the-proposed-ban-of-carbon-dioxide-for-rodent-euthanasia>>. Acesso em Nov. 2019.

FISCHER, A. W.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans: An experimental study. *Molecular Metabolism*, v. 7, p. 161–170, jan. 2018.

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V. L. L.; RIVERA, E. A. B. Ciência em animais de laboratório. *Ciência e Cultura*, v. 60, n. 2, p. 44–46, 2008.

FRAGOSO, V. M.; YANAAN, H.L.; ARAUJO-JORGE, T. C.; AZEVEDO, M. J.; CAMPOS, J. D. S.; CORTEZ, C. M.; OLIVEIRA, G. M. Use of haloperidol and risperidone in highly aggressive Swiss Webster mice by applying the model of spontaneous aggression (MSA). *Behav Brain Res*. Mar 15; 301:110-8 2016.

FURTADO, A. K.; OLIVEIRA, G. M. Análise De Descritores Relacionada A Importância Do Bem-Estar De Camundongos E A Influência Nos Resultados Dos Ensaio Científicos. *RESBCAL*, São Paulo, v.6 n.2, pg. 111-128, 2018.

FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL (FAWC). *Farm Animal Welfare Council: Report on priorities for animal welfare research and development*. London: FAWC, 1993.

FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL (FAWC). *Farm Animal Welfare Council: Farm Animal Welfare in Great Britain: Past, Present and Future*. London: FAWC, 2009.

FRASER D.; KHARB, R. M.; MCCRINDLE; C.; MENCH, J.; COSTA, M. P.; PROMCHAN, K.; SUNDRUM, A.; THORNER, P.; WHITTINGTON, P.; SONG, W.; Capacitação para implementar boas práticas de bem-estar animal. Relatório do Encontro de Especialistas da FAO, Roma, 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/boas-praticas-e-bem-estar-animal/arquivos-publicacoes-bem-estar-animal/capacitacao-para-implementar-boas-praticas-em-bem-estar-animal.pdf>>. Acesso em: 05 de maio de 2019.

FRASER D. *Understanding Animal Welfare: The science in its cultural context*. WileyBlackwell: Oxford, 2008, 324 p.

GÄRTNER, K.; BÜTTNER, D.; DÖHLER, K.; FRIEDEL, R.; LINDENA, J.; TRAUTSCHOLD, I. Stress response of rats to handling and experimental procedures. (1980). *Laboratory Animals*, 14(3), 267–274.

GILMORE, A. J.; BILLING, R. L.; EINSTEIN, R. The effects on heart rate and temperature of mice and vas deferens responses to noradrenaline when their cage mates are subjected to daily restraint stress. *Laboratory Animals*, v. 42, n. 2, p. 140–148, 1 abr. 2008.

GOLDIM, J. R.; RAYMUNDO, M. M. *Pesquisa em Saúde e os Direitos dos Animais*. 2 ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

GOLTSTEIN, P. M.; REINERT, S.; GLAS, A.; BONHOEFFER, T.; HÜBENER, M. Food and water restriction lead to differential learning behaviors in a head-fixed two-choice visual discrimination task for mice. *PLoS ONE*, v. 13, n. 9, p. e0204066, 2018.

GONÇALVES, M. A. B. et al. Comportamento e bem-estar animal: o enriquecimento ambiental. In ANDRADE, A.; ANDRADE, M. C. R.; MARINHO, A. M.; FILHO, J.F. (Orgs.). *Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2010. p.137–160.

GOODRICH, J. K.; WATERS, J. L.; POOLE, A. C.; SUTTER, J. L.; KOREN, O.; BLEKHMANN, R.; BEAUMONT, M.; VAN TREUREN, W.; KNIGHT, R.; BELL, J. T.; SPECTOR, T. D.; CLARK, A. G.; LEY, R. E. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, v. 159, n. 4, p. 789–799, 6 nov. 2014.

GUIMARÃES, M. V.; FREIRE, J. E. DA C.; MENEZES, L. M. B. DE. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. *Revista Bioética*, v. 24, p. 217–224, 2016.

HAAG, M. T.; WELLS, K. D.; LAMBERSON, W. R. Genetic, maternal, and heterosis effects on voluntary water consumption in mice. *Journal of Animal Science*, v. 96, n. 8, p. 3055–3063, 28 jul. 2018.

HALLER, M.; MIRONOV, S. L.; RICHTER, D. W. Intrinsic Optical Signals in Respiratory Brain Stem Regions of Mice: Neurotransmitters, Neuromodulators, and Metabolic Stress. *Journal of Neurophysiology*, v. 86, n. 1, p. 412–421, 1 jul. 2001.

HALLER, J.; BAKOS, N.; RODRIGUIZ, R. M.; CARON, M. G., WETSEL, W. C. Liposits, Z.; Behavioral responses to social stress in noradrenaline transporter knockout mice: Effects on social behavior and depression. *Brain Research Bulletin*, v. 58, n. 3, p. 279–284, 1 jul. 2002.

HAMILTON, D. A.; BARTO, D.; RODRIGUEZ, C. I.; MAGCALAS, C. M.; FINK, B. C.; RICE, J. P.; BIRD, C. W.; DAVIES, S.; Savage, D. D. Effects of moderate prenatal ethanol exposure and age on social behavior, spatial response perseveration errors and motor behavior. *Behavioural Brain Research*, v. 269, p. 44–54, 2014.

IWANIEC, U. T.; PHILBRICK, K. A.; WONG, C. P.; GORDON, J. L.; KAHLER-QUESADA, A. M.; OLSON, D. A.; BRANSCUM, A. J.; SARGENT, J. L.; DEMAMBRO, V. E.; ROSEN, C. J.; TURNER, R. T. Room temperature housing results in premature cancellous bone loss in growing female mice: implications for the mouse as a preclinical model for age-related bone loss. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, v. 27, n. 10, p. 3091–3101, out. 2016.

JACOBSEN, K. R.; JØRGENSEN, P.; PIPPER, C. B.; STEFFENSEN, A. M.; HAU, J.; ABELSON, K. S. The Utility of Fecal Corticosterone Metabolites and Animal Welfare Assessment Protocols as Predictive Parameters of Tumor Development and Animal Welfare in a Murine Xenograft Model. *In Vivo*, v. 27, n. 2, p. 189–196, 1 mar. 2013.

JI, Z.-H.; REN, W. Z.; GAO, W.; HAO, Y.; CHEN, J.; QUAN, F. S.; HU, J. P.; YUAN, B. Analyzing the innate immunity of NIH hairless mice and the impact of gut microbial polymorphisms on *Listeria monocytogenes* infection. *Oncotarget*, 8(63), 106222–106232. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22051> Analyzing the innate immunity of NIH hairless

mice and the impact of gut microbial polymorphisms on *Listeria monocytogenes* infection. *Oncotarget*, v. 8, n. 63, p. 106222–106232, 25 out. 2017.

KATAGIRI, C.; SATO, J.; NOMURA, J.; DENDA, M. Changes in environmental humidity affect the water-holding property of the stratum corneum and its free amino acid content, and the expression of filaggrin in the epidermis of hairless mice. *Journal of Dermatological Science*, v. 31, n. 1, p. 29–35, 1 fev. 2003.

KONSTANDI, M.; JOHNSON, E.; LANG, M.; MALAMAS, M.; MARSELOS, M. Noradrenaline, dopamine, serotonin: different effects of psychological stress on brain biogenic amines in mice and rats. *Pharmacological Research*, v. 41, n. 3, p. 341–346, 1 mar. 2000.

KUZEL, A. A.; OLIVEIRA, F. S.; DEMARQUE, K. C.; RANGEL, J. A.; RODRIGUES, F. V. B.; BATISTA, W. A.; GAMEIRO, L. S.; OLIVEIRA, G. M. Estudo da hierarquia de camundongos Swiss Webster através do uso de sistemas com gaiolas interligadas (SGI). 2013.

LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M; KO, G.M. (Orgs.) Cuidados e manejos de animais de laboratório. 2 ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 2017. p. 11-27.

LANGGARTNER, D.; FOERTSCH, S.; FÜCHSL, A.; REBER, S. Light and water are not simple conditions: fine tuning of animal housing in male C57BL/6 mice. *Stress*, v. 20, n. 1, p. 27–35, 2 jan. 2017.

LEAL PAIXÃO, R. Os desafios das comissões de ética no uso de animais. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 11, p. 84–87, 2008.

LEE, S. H.; HUR, J.; LEE, E. H.; KIM, S. Y. Ginsenoside rb1 modulates level of monoamine neurotransmitters in mice frontal cortex and cerebellum in response to immobilization stress. *Biomolecules & therapeutics*, v. 20, n. 5, p. 482–486, set. 2012.

LIAO, W.; ZHOU, L.; ZHAO, X.; SONG, L.; LU, Y.; ZHONG, N.; YANG, P.; SUN, B.; ZHANG, X. Thermoneutral housing temperature regulates T-regulatory cell function and inhibits ovalbumin-induced asthma development in mice. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 7123–7123, 2 ago. 2017.

MARTINS, T. V. A.; ANDRADE, M. C. R.; FRAIBLAT, Marcel.; PRESGRAVE, O. A. F.; OLIVEIRA, G. M. Avaliação da preferência pelo tipo de enriquecimento ambiental utilizado por camundongos Swiss Webster em biotério através do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI). *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 17-34, 2017.

MATTARAIA, V. G. M. Enriquecimento ambiental. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M; KO, G. M. (Orgs.) Cuidados e manejos de animais de laboratório. São Paulo: Ateneu, 2009. p. 537-547.

MATTARAIA, V. G. M.; OLIVEIRA, G. M. Enriquecimento ambiental. In: MATTARAIA, V. M.; OLIVEIRA, G. M. (Orgs.). Comportamento de Camundongos em Biotério. São Paulo: Poloprint, 2012. p. 223-240.

MEDINA, M. P. Efeitos do enriquecimento ambiental no comportamento e bem-estar de animais de laboratório convencionais. Trabalho de conclusão de graduação - Faculdade de

Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2011. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/60802>>. Acesso em: 20 de jun. de 2019

MELO, M. G. D.; DÓRIA, G.A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. abr. 2012.

MILLER, A.; BURSON, H.; SÖLING, A.; ROUGHAN, J. Welfare Assessment following Heterotopic or Orthotopic Inoculation of Bladder Cancer in C57BL/6 Mice. PLoS ONE, v. 11, n. 7, 27 jul. 2016.

MIRCIOV, C. S. G.; WILKINS, S. J.; ANDERSON, G. J.; FRAZER, D. M. Food deprivation increases hepatic hepcidin expression and can overcome the effect of Hfe deletion in male mice. The FASEB Journal, p. fj.201701497RR, 25 maio 2018.

NAKAMURA, Y.; SUZUKI, K. Tunnel use facilitates handling of ICR mice and decreases experimental variation. The Journal of Veterinary Medical Science, v. 80, n. 6, p. 886–892, jun. 2018.

NEELY, C.; LANE, C.; TORRES, J.; FLINN, J. The Effect of Gentle Handling on Depressive-Like Behavior in Adult Male Mice: Considerations for Human and Rodent Interactions in the Laboratory. Behavioural neurology, v. 2018, p. 2976014–2976014, 6 mar. 2018.

NOVAK, J.; BAILOO, J. D.; MELOTTI, L.; ROMMEN, J.; WÜRBEL, H. An Exploration Based Cognitive Bias Test for Mice: Effects of Handling Method and Stereotypic Behaviour. PloS one, v. 10, n. 7, p. e0130718–e0130718, 8 jul. 2015.

OLIVEIRA, G. M. Hierarquização em Agrupamentos. In: MATTARAIA, V.M.; OLIVEIRA, G.M. (Orgs.). Comportamento de Camundongos em Biotério. São Paulo: Poloprint, 2012. p. 179-194.

OLIVEIRA G.M.; BRITO C.F. Influence of social isolation and aggressive behavior in the appearance of Depression-like in Experimental model. Arch Depress Anxiety 5(2): 042-046. 2019.

OLIVEIRA, F. DA S.; DEMARQUE, K. C.; RANGEL, J. A.; BATISTA, W. S.; GAMEIRO, L. S.; OLIVEIRA, G. M. Dosagem da concentração plasmática de corticosterona em camundongos altamente agressivos da linhagem Swiss Webster. Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, v. 3, n. 2, p. 85–94, 2015.

OLIVEIRA, F. DA S.; RANGEL, J. A.; BATISTA, W. S.; GAMEIRO, L. S.; OLIVEIRA, G. M. Influência da agressividade paterna no desenvolvimento físico/emocional de camundongos Swiss Webster em biotério. 2014.

PACCA LOUREIRO LUNA, S. Dor, senciência e bem-estar em animais - senciência e dor. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 11, p. 17–21, 2008.

PAI-DHUNGAT, J V; PARIKH, F. Heimlich Manoeuvre. *J Assoc Physicians India*; 63(3): 123-4, 2015 Mar.

PHILLIPS, N. E.; SAXON, P. A.; QUIMBY, F. H. Effect of humidity and temperature on the survival of albino mice exposed to low atmospheric pressure. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, v. 161, n. 2, p. 307–311, 1 maio 1950.

PITCHER, M. H.; GONZALEZ-CANO, R.; VINCENT, K.; LEHMANN, M.; COBOS, E. J.; CODERRE, T. J.; BAEYENS, J. M.; CERVERO, F. Mild Social Stress in Mice Produces Opioid-Mediated Analgesia in Visceral but Not Somatic Pain States. *The Journal of Pain*, v. 18, n. 6, p. 716–725, 1 jun. 2017.

REBOLLO, R. A. A difusão da doutrina da circulação do sangue: a correspondência entre William Harvey e Caspar Hofmann em maio de 1636. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 9, p. 479–513, 2002.

REIS-SILVA, T. M.; SANDINI, T. M.; CALEFI, A. S.; ORLANDO, B. C. G.; MOREIRA, N.; LIMA, A. P. N.; FLORIO, J. C.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N. G. T.; BERNARDI, M. M. Stress Resilience Evidenced by Grooming Behaviour and Dopamine Levels in Male Mice Selected for High And Low Immobility using the Tail Suspension Test. *European Journal of Neuroscience*, v. 0, n. ja, 19 mar. 2019.

REITER, C. P.; CHRISTY, A. C.; OLSEN, C. H.; BENTZEL, D. E. Effect of Home Cage Bedding in the Induction Chamber on Serum Cortisol and Corticosterone Levels in Response to Isoflurane-induced Anesthesia in C57BL/6J Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*. 56(2):118-121. 2017.

RETANA-MÁRQUEZ, S.; BONILLA-JAIME, H.; VÁZQUEZ-PALACIOS, G.; MARTÍNEZ-GARCÍA, R.; VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones and Behavior*, v. 44, n. 4, p. 327–337, 1 nov. 2003.

REZENDE, A. H.; PELUZIO, M. C. G.; SABARENSE, C. M. Experimentação animal: ética e legislação brasileira. *Revista de Nutrição, Campinas*, v. 21, n. 2, p. 237-242, 2008.

RIMBACH, R.; JÄGER, J.; PILLAY, N.; SCHRADIN, C. Food Availability Is the Main Driver of Seasonal Changes in Resting Metabolic Rate in African Striped Mice (*Rhabdomys pumilio*). *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 91, n. 2, p. 826–833, 30 jan. 2018.

RIVERA, E. A. B. Bem-Estar de Animais de Laboratório. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M; KO, G. M. (Orgs.). *Cuidados e manejos de animais de laboratório*. 2. ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 2017. p. 35-45.

ROSENBAUM M. D., VANDEWOUDE, S, JOHNSON, T. E. Effects of Cage-Change Frequency and Bedding Volume on Mice and Their Microenvironment. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*. 2009;48(6):763-773.

- ROSENBAUM, M. D.; VANDEWOUDE, S.; VOLCKENS, J.; JOHNSON, T. Disparities in ammonia, temperature, humidity, and airborne particulate matter between the micro-and macroenvironments of mice in individually ventilated caging. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, v. 49, n. 2, p. 177–183, mar. 2010.
- SANTACROCE, L.; BOTTALICO, L.; CHARITOS, I. A. Greek Medicine Practice at Ancient Rome: The Physician Molecularist Asclepiades. *Medicines (Basel, Switzerland)*, v. 4, n. 4, p. 92, 12 dez. 2017.
- MUNDT, S.; GROETTRUP, M.; BASLER, M. Analgesia in mice with experimental meningitis reduces pain without altering immune parameters. *ALTEX*, v. 32, n. 3, p. 183–189, 2015.
- SCHANAIDER, A.; SILVA, P. C. The use of animals in experimental surgery. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 19, n. 4, p. 441–447, ago. 2004.
- SECKLEHNER, J.; RICHARDSON, C. A. The reporting of animal welfare details in liver research: A review of studies describing bile duct ligation in mice (2011–2013). *Journal of Hepatology*, v. 62, n. 1, p. 250–251, 1 jan. 2015.
- SOUSA, F. S. S.; BIRMANN, P. T.; BALAGUEZ, R.; ALVES, D.; BRÜNING, C. A.; SAVEGNAGO, L. α -(phenylselanyl) acetophenone abolishes acute restraint stress induced-comorbid pain, depression and anxiety-related behaviors in mice. *Neurochemistry International*, v. 120, p. 112–120, 1 nov. 2018.
- SPANGENBERG, E. M.; KEELING, L. J. Assessing the welfare of laboratory mice in their home environment using animal-based measures – a benchmarking tool. *Laboratory Animals*, v. 50, n. 1, p. 30–38, 23 mar. 2015.
- SUNDSTRÖM, L. Dispersal polymorphism and physiological condition of males and females in the ant, *Formica truncorum*. *Behavioral Ecology*, v. 6, n. 2, p. 132–139, 1 dez. 1995.
- TAGHIPOUR, N.; MOLAEI, M.; MOSAFFA, N.; ROSTAMI-NEJAD, M.; ASADZADEH AGHDAEI, H.; ANISSIAN, A.; AZIMZADEH, P.; ZALI, M. R. An experimental model of colitis induced by dextran sulfate sodium from acute progresses to chronicity in C57BL/6: correlation between conditions of mice and the environment. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, v. 9, n. 1, p. 45–52, 2016.
- TSUBOTA, M.; MIYAMOTO, T., HIRUMA, S.; SAEKI, H.; MIYAZAKI, T.; SEKIGUCHI, F.; FUNAKAMI, Y.; KAWABATA, A. Repeated Cold Stress Reduces Cyclophosphamide-Induced Cystitis/Bladder Pain and Macrophage Activity in Mice. *Pharmacology*, v. 99, n. 5–6, p. 286–290, 2017.
- YILDIRIM, F.; APAYDIN, B.; YILDIZ, A.; TERIM, K.; CENGIZ, S.; ÖZDEMİR, S. Evaluation of perlite, wood shavings and corncobs for bedding material in rats. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 88, n. 0, p. e1–e7, 30 mar. 2017

ANEXO



Instituto Oswaldo Cruz
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA**L-004/2016**

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-055/2015), intitulado "Utilização do Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI) para o estudo de preferência comportamental em camundongos da linhagem Swiss Webster", sob a responsabilidade de **GABRIEL MELO DE OLIVEIRA** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 30/11/2018 e inclui o uso total de:

Camundongo, cepa:

Mus musculus / Swiss Webster – 160 animais machos – 3 semanas de vida
Mus musculus / Swiss Webster – 100 animais machos – 5 semanas de vida
Mus musculus / Swiss Webster – 100 animais machos – 7 semanas de vida
Mus musculus / Swiss Webster – 24 animais machos – 8 semanas de vida
Mus musculus / Swiss Webster – 12 animais fêmeas – 10 semanas de vida

Rio de Janeiro, 17 de fevereiro de 2016.

Flávio Alves Lara

Coordenador Adjunto da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056