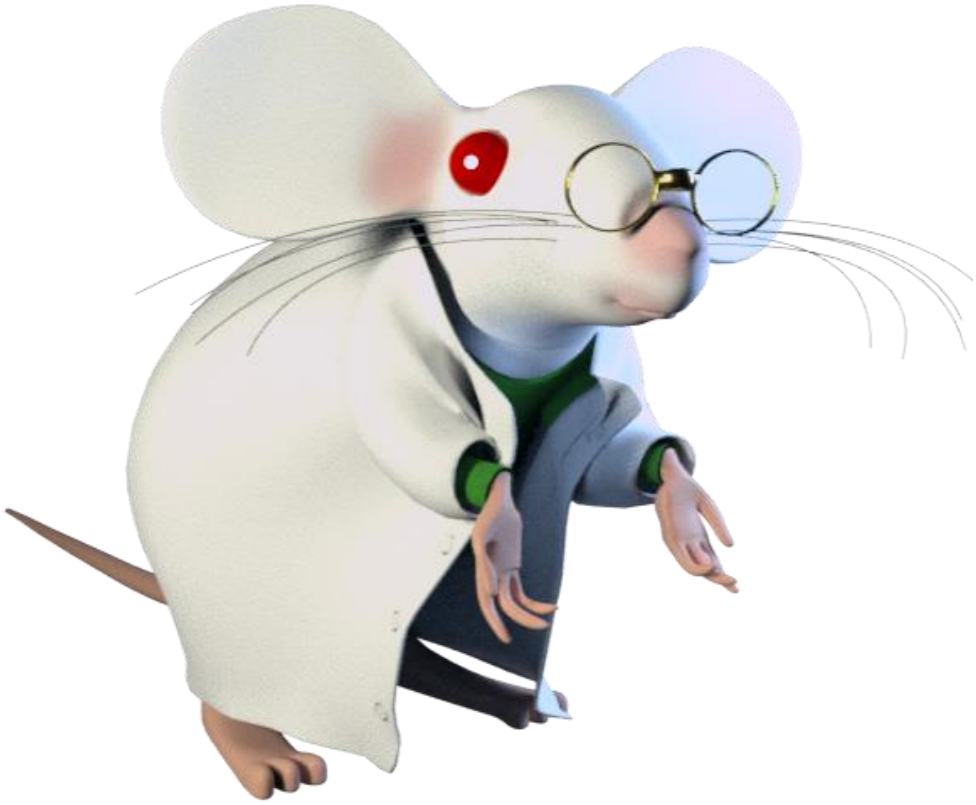


INICIAÇÃO EM CIÊNCIAS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Rio de Janeiro – RJ

2023

DIRETOR

Christoph Schweitzer Milewski

VICE-DIRETOR DE ENSINO , PESQUISA E INOVAÇÃO

Carlos Eduardo de Andrade Lima da Rocha

COORDENAÇÃO

Maria Inês Doria Rossi

CONTEUDISTAS

Aline da Cruz Repolez

André Abbagliato

Andre da Silva Matos

Maria Inês Doria Rossi

Fabienne Petitinga de Paiva

Gabriel Melo de Oliveira

Hugo Leonardo de Melo Dias

Jenif Braga de Souza

Klena Sarges Marruaz Silva

Monica Souza Ferreira Pinto

DESIGN INSTRUCIONAL

Lúcia Emilia Figueiredo de Sousa Rebello

PRODUÇÃO AUDIOVISUAL

Ross Louis Miller Neto

WEBDESIGN

Rodrigo Rodrigues de Andrade

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	4
INTRODUÇÃO	5
UNIDADE I A CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO	6
Capítulo 1 Evolução e importância da CAL	7
Capítulo 2 Ética e Legislação em CAL	10
Capítulo 3 O princípio dos 3 RS	15
Capítulo 4. Os animais de laboratório	16
UNIDADE II INSTALAÇÃO ANIMAL, BARREIRAS SANITÁRIAS E BIOSSEGURANÇA	18
Capítulo 1 Estrutura física e classificação de Biotérios	18
Capítulo 2 Instalações e Barreiras Sanitárias	19
Capítulo 3 Biossegurança em Biotérios	20
Capítulo 4. Biologia e Manejo de camundongos (*mus musculus*)	21
Capítulo 5. Biologia e Manejo de Cobaias (*Cavia Porcellus*	32
Capítulo 6. Biologia e Manejo **de Coelhos (*Oryctolagus cuniculus***	38
UNIDADE III BEM-ESTAR ANIMAL E A CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO	49
Capítulo 1 Biologia, etologia e bem-estar animal	49
Capítulo 2 Procedimentos básicos para manipulação das principais espécies e vias de coleta de sangue e inoculação de fármacos	53
Capítulo 3 Reconhecimento do estresse, da dor e do sofrimento animal	65
AVALIAÇÃO	66
LINKS DE VÍDEOS	73
LINKS DE TEXTOS	74
LINKS IMPORTANTES	74
BIBLIOGRAFIA	75

APRESENTAÇÃO

Caro aluno

A proposta editorial deste Caderno de Estudos e Pesquisa reúne elementos que se entendem necessários para o desenvolvimento do estudo com segurança e qualidade. Caracteriza-se pela atualidade, dinâmica e pertinência de seu conteúdo, bem como pela interatividade e modernidade de sua estrutura formal, adequadas à metodologia da Educação a Distância – EaD. Pretende-se, com este material, levá-lo à reflexão e à compreensão da pluralidade dos conhecimentos a serem oferecidos, possibilitando-lhe ampliar conceitos específicos da área e atuar de forma competente e conscienciosa, como convém ao profissional que busca a formação continuada para vencer os desafios que a evolução científico-tecnológica impõe ao mundo contemporâneo. Elaborou-se a presente publicação com a intenção de torná-la subsídio valioso, de modo a facilitar sua caminhada na trajetória a ser percorrida tanto na vida pessoal quanto na profissional. Utilize-a como instrumento para seu sucesso na carreira.

Conselho Editorial

INTRODUÇÃO

O Curso de Iniciação em Ciência em Animais de Laboratório vem sendo oferecido na modalidade de ensino presencial com grande êxito. No entanto, a Educação a Distância (EaD) tem sido considerada uma das principais inovações na área educacional nos últimos tempos. Buscando atender a este novo cenário e as demandas por cursos na área, a Coordenação de Ensino do ICTB lança a proposta de um curso autoinstrucional online com a mesma carga horária, expertises docentes e comprometimento com um ensino de qualidade.

O Curso adotará o modelo EAD Autoinstrucional (curso a distância sem tutoria), visando garantir a autonomia e independência do aluno, a partir de um desenho autoexplicativo, abordando a temática de maneira simples e objetiva.

O processo de ensino-aprendizagem envolve o uso de ferramentas educacionais como materiais de estudo e a oferta de links para artigos e vídeos. Além disso, a partir de uma situação-problema previamente definida, o estudante será estimulado a aprender mais sobre determinados assuntos a partir da pesquisa e leituras complementares que tornarão o aluno protagonista de seu aprendizado.

Ao final das aulas, será aplicada uma atividade verificadora da aprendizagem que tem uma finalidade formativa, ou seja, que não é pontual e estática, mas um processo dinâmico, inclusivo e diagnóstica em relação a efetividade do aprendizado.

O objetivo é proporcionar conhecimentos básicos em Ciência em Animais de Laboratório (CAL), a fim de formar profissionais habilitados para a atuação na área de forma ética, calcados nas normativas e legislação vigente voltadas para o bem-estar animal.

Bons estudos e belas ideias!

UNIDADE 1.

A CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO (CAL)

Introdução

Você sabia que apesar do homem há muito tempo utilizar animais em experimentos na busca do conhecimento científico e benefício para a saúde de ambos, por muito tempo os animais utilizados foram relegados a um segundo plano dentro do contexto científico. Pois é, só foi possível falar de Ciência em Animais de Laboratório (CAL) a partir de uma percepção bem recente da importância do modelo animal e seu bem-estar para os resultados de um experimento. Desta forma, ganha destaque o próprio animal como tema de estudo, buscando compreender como este deve ser criado e manipulado.

É possível afirmar que a CAL possui uma abordagem multidisciplinar. Este tipo de abordagem engloba uma série de áreas - sanidade, genética, manejo, bem-estar e educação - que servem de base para todas as outras ciências que utilizam animais em seus trabalhos. Desse modo, visa proporcionar um maior conhecimento do modelo animal e suas necessidades etológicas, promovendo o refinamento experimental e, consequentemente, o bem-estar animal.

Nesta unidade, a importância da Ciência em Animais de Laboratório, ganha destaque. Sendo assim, serão apresentados conhecimentos básicos sobre aspectos históricos, conceituais, éticos e de regulamentação, contribuindo para formação de profissionais comprometidos com o bem-estar animal. Serão abordados temas tais como: a evolução e importância da CAL; os princípios éticos e a legislação em CAL no Brasil, o princípio dos 3 Rs e os animais de laboratório.

Capítulo 1 . Evolução e importância da CAL

Os primeiros registros de anotações anatômicas datam de 500 aC, época em que viveu Alcméon, médico e filósofo Grego, nascido em Crotona. Estes estudos foram feitos em animais , não há registro se estavam vivos ou mortos, e foi também o primeiro a dissecar um cadáver humano, o que era um tabu neste período.

Na época acreditava-se que os animais não sentiam dor e nem possuíam alma. Desta forma, nenhum sedativo ou anestésico era utilizado, até porque os medicamentos anestésicos só seriam desenvolvidos na década de 1840 da era moderna[1]. Estas condutas passaram muito tempo sendo reproduzidas até que se percebeu a necessidade de mudá-las visando evitar, por exemplo, a vocalização e contorcionismo dos animais manipulados naqueles experimentos.

Desde os primeiros registros das observações anatômicas de Alcmêon, outros estudos anatômicos foram registrados por filósofos e médicos gregos. Em 460 aC, Hipócrates, considerado o "pai da medicina", foi quem começou a relacionar os órgãos doentes de humanos com o de animais, sendo considerado um importante pioneiro na área da anatomia. No século III a.C., Aristóteles, denominado "pai da biologia", dissecou mais de 50 espécies de animais. É importante observar que por enquanto ainda estamos falando de dissecação e não de vivissecção.

Você sabe a diferença entre dissecação e vivissecção?

Dissecação anatômica é o ato ou efeito de dissecar, de fazer a separação metódica e organizada de alguma estrutura anatômica em animais mortos. O termo vivissecção é a dissecação anatômica ou qualquer procedimento realizado em animal vivo para estudo de algum fenômeno fisiológico.

O médico grego Herófilo também foi muito importante nos estudos de anatomia. Como na Grécia antiga não era permitida a dissecação de cadáveres humanos Herófilo fez seus estudos no Egito, onde as técnicas de embalsamamento dos corpos já haviam sido desenvolvidas. Desta forma, ele ampliou os seus conhecimentos de anatomia ao fazer as dissecações e a retirada de órgãos dos corpos que seriam embalsamados, bem como dos animais que eram sepultados junto com seus donos. Estes estudos foram ponto de partida para a criação da Escola de Medicina de Alexandria.

No período da era Cristã, o médico Cláudio Galeno (129-199 dC), considerado o "príncipe dos médicos", foi o primeiro a realizar vivissecção com objetivos experimentais para observar as alterações em animais vivos, sendo considerado fundador da medicina experimental. Foi através desse procedimento que Galeno pode relatar importantes características estruturais dos vasos sanguíneos e descobrir que artérias transportavam sangue em vez de ar, como se acreditava há centenas de anos (GUIMARÃES, FREIRE E MENEZES, 2016). Apesar de poder ter havido experiências anteriores, Galeno é considerado o mais antigo cientista a utilizar a vivissecção que se tem registro.

1 A descoberta da vacina foi uma inovação que revolucionou os procedimentos cirúrgicos. A anestesia com éter foi descoberta em Boston, na década de 1840, porém a primeira demonstração pública de cirurgia com anestesia com éter foi realizada em 1846 no Hospital Geral de Massachusets, mas só foi amplamente aceito na medicina por volta de 1853.

É possível perceber uma relação direta entre a experimentação animal e o pensamento da Idade Média, tempo em que religião e ciência não eram claramente distintas. Após esse período, no Renascimento, o surgimento do antropocentrismo, doutrina filosófica que atribui ao ser humano uma posição de centralidade em relação a todo o universo, colocou o homem como centro das preocupações. Essa visão consolidou a ideia de que todas as coisas existentes deveriam servir à espécie humana, sustentando ainda mais a experimentação animal como método padrão de investigação científica e de finalidade didática na medicina (GUIMARÃES, FREIRE E MENEZES, 2016)

Essa concepção prevaleceu nos séculos seguintes, principalmente no período do racionalismo moderno, no século XVII, quando a experimentação animal atingiu seu auge.

Foi já em meados do século XVII que o filósofo René Descartes formulou a teoria do animal-máquina (do francês *"bête machin*e"). Trata-se da chamada "teoria mecanicista", em que animais não seriam mais do que simples máquinas e sendo assim, estariam excluídos da esfera das preocupações morais humanas. Ele justificava esta teoria ao afirmar que os animais como seres desprovidos de espírito e, portanto, destituídos de sentimentos e incapazes de sentir dor ou prazer, diferenciando-se da espécie humana. Descartes afirmava que você poderia cortá-los, abri-los que eles não sentiriam nada, que as reações eram apenas um ato reflexo (GUIMARÃES, FREIRE E MENEZES, 2016).

Nos séculos XVIII-XIX, com base neste pensamento cartesiano, dois médicos fisiologistas, François Magendie (1783-1855) e seu sucessor Claude Bernard (1813-1878), contribuíram para o estabelecimento do método científico, que pode ser definido como um conjunto de procedimentos baseados na observação sistemática e controlada que permitem a construção do conhecimento científico.

Assim, para que houvesse o estabelecimento do método científico, Magendie e Bernard utilizavam os animais vivos nas salas de aula e nas práticas com os alunos.

A literatura cita que o **Claude Bernard** não tinha o menor receio quando cortava o animal vivo que naturalmente gritava, mas sem piedade, até batia no animal, porque afirmava que o sangue e o grito do animal não podiam ser mais importantes do que as descobertas científicas. Nessa época era comum a utilização de sapos nos experimentos, bem como também eram comuns gatos e cães.

Claude Bernard não tinha limites, em uma aula prática, como não havia animais disponíveis, pegou o cachorro de estimação de sua filha e o utilizou para experimentos e, obviamente, o animal morreu. Em razão desse fato, sua esposa **Marie-Françoise Bernard** decidiu se divorciar dele e criar a primeira sociedade anti-vivissecção.

Em 1789 o filósofo e jurista Jeremy Bentham, responsável pela sistematização do utilitarismo, doutrina ética que afirma que as ações são boas quando tendem a promover a felicidade e más quando tendem a promover o oposto da felicidade, lançou a base para os princípios morais e a legislação atualmente utilizada nas regulamentações éticas dos procedimentos de experimentação animal, contrapondo-se à teoria criada por Descartes.

Em seus tratados filosóficos, Benthan estimulou a sociedade a discutir a veracidade da incapacidade de sofrimento por parte dos animais. Ele argumentava que a capacidade de sofrer, e não a capacidade de raciocinar, deve ser levada em consideração na forma de tratamento a outros seres. Essa linha de raciocínio foi propagada no século XIX, quando paralelamente ao crescimento do uso de animais em laboratórios de

pesquisas científicas, surgiram as primeiras entidades protetoras dos animais, estendendo-se até os dias atuais (GUIMARÃES, FREIRE E MENEZES, 2016).

O naturalista e cientista inglês Charles Darwin (1809-1882), autor do livro 'A Origem das o que Espécies' de 1859, é citado no artigo sugerido como leitura complementar. Sua tese da origem comum entre animais e humanos, por um lado, afirmava a importância e justificava cientificamente o uso de animais em estudos de fisiologia experimental, mas, por outro lado, também fortalecia o questionamento da legitimidade moral da exploração dos animais pela ciência" (CARVALHO; WAIZBORT, 2012).

Como você pode ver, ao longo de décadas a ciência em animais de laboratório vem passando por constantes lapidações. Como toda ciência esta não é estática e imutável. Os aperfeiçoamentos /melhoramentos na CAL vão desde os microambientes dos animais, macroambientes, biomodelos, protocolos de eutanásia, anestesia, criação e produção. Ainda bem que a ciência vem evoluindo e buscando cada vez mais o bem-estar animal como prioridade.

As mudanças no alojamento animal

Os microambientes, também conhecidos como gaiolas**,** já foram de madeira com tampa de aço considerada como aberta e hoje são de polipropileno, policarbonato cristal ou polisulfona com tampas de aço galvanizado, inox ou alumínio modalidade aberta ou fechada sendo esta última caracterizada como **micro isolador**. O objetivo dessa evolução nas unidades de alojamento dos animais é em prol do bem-estar deles e esse bem-estar é composto por melhor higiene das gaiolas, dimensões das gaiolas e claro durabilidade e resistência delas.

Os macroambientes (salas animais) passaram por melhoramentos visando, por exemplo, a contenção de aerossóis gerados na sala, a introdução ou extravasamento de contaminantes que possam interferir na saúde, bem-estar dos animais, de humanos e no resultado dos experimentos. As principais mudanças pertencem a implantação de cortinas de ar nas entradas e saídas das salas, sistemas de exaustão e climatização adequados para a espécie, para a estrutura física do biotério e os objetivos de pesquisa da instituição. A diferença de pressão entre as salas de animais e os corredores de distribuição e recolhimento é também uma ferramenta para evitar contaminantes entre os ambientes.

Capítulo 2. Ética e legislação em CAL

A utilização de animais e a sua relação com o ser humano têm levado a um processo amplo de reflexão e apontamento de problemas sobre a maneira natural como o ser humano usava os animais e sobre as bases sociais sobre as quais foram construídos esses hábitos. Tais práticas sociais passam a ser contextualizadas e contestadas não apenas em relação à vida humana, mas de uma maneira mais ampla perante a vida como um todo.

Diante das novas demandas que a sociedade apresenta em relação ao tratamento digno dos animais envolvidos em ensino e pesquisa, surgiu o questionamento sobre qual seria a visão dos profissionais afetos às áreas que utilizam os animais, já que estes se tornam, mais com seus exemplos que com suas palavras, formadores de opinião, multiplicadores de valores agregados a essa prática e geradores de questionamentos (OLIVEIRA et al., 2013).

De uma forma ampla essa mudança de pensamento foi fortalecida pela publicação do livro denominado Os Princípios da Técnica Experimental Humana (*The principles of humane experimental technique*) cujos autores são Russel e Burch. Esse livro consagrou-se por conter o importante princípio dos 3Rs, o qual se preocupa com o uso e o bem-estar dos animais envolvidos em experimentos e ou uso educacional (TANNENBAUM; BENNETT, 2015)after its ideas had gained widespread interest in the scientific community. In the Principles, Russell and Burch proposed a new applied science that would improve the treatment of laboratory animals while advancing the quality of science in studies that use animals. They introduced and defined the terms replacement, reduction, and refinement, which subsequently have become known as ‘alternatives’ or ‘alternative methods’ for minimizing the potential for animal pain and distress in biomedical research. Here we describe and explain the original definitions of the 3Rs in the Principles, examine how current definitions differ among themselves and from Russell and Burch’s definitions, and suggest relevant considerations for evaluating all definitions of the 3Rs.”,”URL”:”http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4382615/”,”ISSN”:”1559-6109”,”note”:”PMID: 25836957\nPMCID: PMC4382615”,”shortTitle”:”Russell and Burch’s 3Rs Then and Now”,”journalAbbreviation”:”J Am Assoc Lab Anim Sci”,”author”:[{“family”:”Tannenbaum”,”given”:”Jerrold”},{“family”:”Bennett”,”given”:”B Taylor”}],”issued”:{“date-parts”:[[“2015”,3]]},”accessed”:{“date-parts”:[[“2017”,5,21]]}}],”schema”:”https://github.com/citation-style-language/schema/raw/master/csl-citation.json”} .

A preocupação com o bem-estar animal no Brasil é verificada na Lei n.º 11.794 de 8 de outubro de 2008, conhecida como Lei Arouca, que em seu art. 5º, determina ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) a competência de “formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com a finalidade de ensino e pesquisa científica”(OLIVEIRA et al., 2013).

> *“Como a Lei Brasileira não abrange todos os temas importantes relacionados ao uso e cuidado de animais experimentais, o Conselho Nacional de controle de experimentação animal (CONCEA) e seu grupo de” ad hoc “estão trabalhando na preparação do guia brasileiro sobre o cuidado e utilização de animais de laboratório que abrangerá os seguintes itens: ética e*

bem-estar dos animais, ambiente, educação, formação e competência do pessoal, transporte, habitação, enriquecimento, pecuária e meio ambiente, cuidados veterinários, conduta de experimental procedimentos, equipamentos e instalações. "

(tradução livre)(RIVERA et al., 2014).

Uma das preocupações quando a Lei n.º 11.794/2008 foi promulgada era que, assim como uma regra, as normas legais não são autoexecutáveis e requerem a ação do poder executivo para garanti-las. Em alguns casos o legislador é incapaz de predizer as hipóteses de incidência da norma jurídica(MARQUES; MORALES; PETROIANU, 2009).

A pesquisa é dinâmica e a Lei é estática. A Lei deve ser apta para não paralisar o processo criativo da pesquisa, o que é o mesmo que impor decadência a ele (MARQUES; MORALES; PETROIANU, 2009).

A Lei n.º 11.794, de 08 de outubro de 2008[2], também chamada de Lei Arouca, devido ao deputado Sérgio Arouca ter sido o autor do projeto de Lei (PL), que completou 10 anos em outubro de 2018. Essa Lei foi um marco para os profissionais que utilizam animais em pesquisas científicas e no ensino de nível superior e de nível médio-técnico da área biomédica, pois até 2008 não existia uma legislação específica para regulamentar o uso de animais de laboratório (MACHADO et al., 2010).

Após longos 13 anos de trâmite no congresso nacional e diversas modificações feitas no projeto original, PL 1.153/1995, com a finalidade de conciliar as necessidades da experimentação com os anseios dos ativistas de proteção animal, em 08 de Outubro de 2008 foi sancionada pelo presidente Luiz Inácio da Silva a Lei 11. 794, ou a Lei Arouca (MACHADO et al., 2010) .

Atualmente, o uso de animais de laboratório, somente pode ser realizado se não houver nenhum método alternativo capaz de substituir o animal. Contudo, ainda em grande parte dos procedimentos insubstituível o uso dos animais, mas a crescente preocupação com os direitos dos animais e o seu bem-estar fez com que tivéssemos que repensar a forma que os utilizamos.

Efetivamente, a Lei n.º 11.794/2008 veio regulamentar o uso de animais em práticas didático-científicas que até então não eram regulamentadas pelas normas anteriores. Fica muito evidente que na legislação anterior a principal preocupação era apenas a proteção aos maus tratos. Uma exceção é a Lei n.º 6.638 de 08 de maio de 1979, que era mais relacionada ao tema da permissão do uso de animais na prática da **vivissecção[3].**

A Lei n.º 6.638 de 08 de maio de 1979 foi revogada pela Lei n.º 11.794/2008, que regulamentou o uso de animais em práticas didático-científicas de forma mais abrangente, e, que até então, não tinham sido consideradas.

2 Para saber mais sobre Sergio Arouca visite o portal https://portal.fiocruz.br/sergio-arouca

3 A vivissecção consiste no ato de dissecar um animal vivo para realizar estudos anatômicos. Trata-se de uma intervenção invasiva num organismo vivo, com motivações científico-pedagógicas. A referência mais antiga à prática da vivissecção atribui-se a Aristóteles, mas a sua utilização sistemática, com intuitos científicos, deve-se a Galeno, no século I DC. Fonte: https://biologo.com.br/bio/vivisseccao/

O ordenamento jurídico brasileiro.

Atribui-se a **Hans Kelsen** o pioneirismo de estruturar o direito como um ordenamento jurídico. Segundo este autor, o direito não é a norma de forma isolada, mas um conjunto ou um sistema, segundo sua visão hierárquica piramidal cuja norma maior valida às demais e dela derivam e constituem um conjunto sistêmico e ordenado (MOTA, 2012).

O ordenamento proposto por Hans Kelsen pressupõe o princípio de que uma norma para ter validade se origina de outra que a antecede e lhe é superior, ascendendo até a norma fundamental que legitima todas as outras e ao próprio ordenamento jurídico como um todo, assim criando um escalonamento decrescente de acordo com a importância das normas (MOTA, 2012).



Fonte: KELSEN, 1998"edition":"6ª","source":"Open WorldCat","event-place":"São Paulo","URL":"https://www.portalconservador.com/livros/Hans-Kelsen-Teoria-Pura-do-Direito.pdf","ISBN":"83-336-0836-5","-note":"OCLC: 940010467","language":"Portuguese","author":[{"family":"Kelsen","given":"Hans"}],"-translator":[{"literal":"João Baptista Machado"}],"issued":{"date-parts":[["1998"]]},"accessed":{"date--parts":[["2019",2,9]]}}],"schema":"https://github.com/citation-style-language/schema/raw/master/csl-citation.json"} - Pirâmide de *Kelsen* demonstrando o ordenamento jurídico http://resumosparaconcursoro.blogspot.com/2013/09/direito-constitucional-1-nocoes.html.

No Brasil, a Constituição Federal ocupa o topo da pirâmide de Kelsen por ser uma norma geradora que rege as relações legais de nosso país, seguida pelas Leis complementares, Leis ordinárias, decretos, medidas provisórias e por fim as resoluções.

A legislação brasileira sobre animais de laboratório

O Decreto n.º 24.645 de 10 de Junho de 1934 - Estabelece medidas de proteção aos animais. Esse decreto foi pioneiro em estabelecer medidas de proteção aos animais, porém com um conteúdo muito mais direcionado para os animais de grande porte, animais de serviço de forma em geral, pois serviam como forma de tração de bondes, charretes e carroças. Assim, de uma forma ampla em seu artigo 1º, tutela TODOS os animais existentes no país de forma geral, dando-lhes a proteção do Estado (BRASIL, 1934).

> O Art. 3º do decreto n.º 24.645, de 10 de julho de 1934, elenca os atos considerados como maus tratos aos animais, dos quais podemos relacionar especialmente alguns itens com o uso de animais destinados a pesquisa e ensino, apesar de não haver nenhuma referência direta com o item do Art.3º.
>
> I - Praticar ato de abuso ou crueldade em qualquer animal;
>
> V - Abandonar animal doente, ferido, extenuado ou mutilado, bem coma deixar de ministrar-lhe tudo o que humanitariamente se lhe possa prover, inclusive assistência veterinária;
>
> VI - Não dar morte rápida, livre de sofrimentos prolongados, a todo animal cujo extermínio seja necessário, parar consumo ou não; (BRASIL, 1934)

O Decreto Lei n.º 3.688 de 3 de Outubro de 1941 - Conhecida como a Lei de contravenções penais, apesar de não ser um decreto voltado especificamente para a proteção animal, como seu antecessor, o decreto n.º 24.645 de 10/06/1934, em consonância com o mesmo, mantém a tutela aos animais de uma forma geral, conforme concedida anteriormente pelo decreto n.º 24.645, de 10 de Julho de 1934, ampliando a pena a ser aplicada aos que violarem o disposto, porém com um avanço na tutela aos animais estendendo a proteção aos animais usados para fins didáticos- científicos em experimentos dolorosos ou cruéis (BRASIL, 1941) .

A Lei n.º 6.638 de 8 de Maio de 1979 - Essa Lei estabelece norma para a prática didático-científica da vivissecção de animais, de uma forma muito simples, a Lei em 8 artigos autoriza a vivissecção nos biotérios, centros de pesquisa e demonstrações com animais vivos desde que registrados em órgão competente que os autorize o funcionamento. Porém, a mesma não estabelece qual são os órgãos aos quais esses estabelecimentos devam se registrar e obter a autorização de funcionamento, tendo ficado estabelecido o prazo de 90 dias para regulamentação e indicação dos órgãos competentes para monitorá-la. Foi revogada pela lei n.º 11.794 de 08 de Outubro de 2008.

> **A Constituição Federativa** 05 de Outubro de 1988 - Carta magna do Brasil, dentre outras coisas estabelece as condições sob as quais não é permitida a vivissecção bem como penas para o seu descumprimento. Carente de regulamentação foi revogada pela Lei n.º 11.794/2008(BRASIL, 1979).

Aprovada pela Assembleia Nacional Constituinte em 22 de setembro de 1988 e promulgada em 05 de outubro de 1988, a Constituição da República Federativa do Brasil de 1988 é a carta magna do Brasil e a Lei geradora de todas outras Leis.

Estabelece em seu art. 225 a proteção ao meio ambiente, o que suscitou a criação da Lei dos crimes ambientais, Lei n.º 9.605 de 12 de fevereiro 1998 e, posteriormente, a Lei n.º11.794 de 08 de outubro de 2008 que estabelece procedimento para o uso científico de animais (BRASIL, 1988).

A Lei n.º 9.605 de 12 de Fevereiro de 1998 - Conhecida também como a Lei de crimes ambientais e promulgada após a constituição de 1988 em resposta ao que estabelece o Art. 225 da Constituição Federal de 1988. Em seu CAPÍTULO V, dos crimes contra o meio ambiente, Seção I, Dos Crimes contra a Fauna (BRASIL, 1998) estabelece:

> Art. 32. Praticar ato de abuso, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos:
>
> Pena - detenção, de três meses a um ano, e multa.
>
> § 1º Incorre nas mesmas penas quem realiza experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos.
>
> § 2º A pena é aumentada de um sexto a um terço, se ocorre morte do animal(BRASIL, 1998).

A Lei n.º 11.794 de 08 de Outubro de 2008 - Também conhecida como Lei Arouca. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

Apesar de considerada um avanço na Legislação voltada para o uso de animais por instituições de Ensino e pesquisa, a Lei n.º11.794/2008 teve como foco principal a criação do CONCEA (Conselho Nacional de Controle a Experimentação Animal) e a estruturação das CEUAs (Comissão de Ética no Uso de Animais) obrigatórias nas instituições que usam animais para fins de pesquisa ou ensino, além de determinar sanções de entidades ou pessoas que cometam transgressões ali determinadas, por haver uma necessidade de criar uma estrutura que viesse a garantir o bem-estar dos animais usados em pesquisas cientificas e em atividades de ensino (BRASIL, 2008).

O Decreto n.º 6.899 de 15 de Julho de 2009 - 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. O decreto veio mais especificamente normatizar a Lei n.º 11.794 de 08 de outubro de 2008, legalizando o CONCEA, bem como dispor da composição de seus quadros, e procedimentos de funcionamento, criar o CIUCA (Cadastro Único de Instituições de Uso Cientifico de Animais) e dispor sobre a criação, a estrutura e aas funções das CEUAs e suas competências, sanções administrativas e penais(BRASIL, 2009).

A Resoluções Normativas do CONCEA (2010 a 2022) - Conselho Nacional de Controle a Experimentação Animal - Dispõem sobre temas diversos ligados a criação animal, experimentação animal e o uso de animais em ensino.

As Resoluções Normativas (RN) elaboradas pelo CONCEA normatizam o uso de animais em pesquisa e ensino de forma mais técnica, dando as bases para o cumprimento da Lei n.º 11.794 de 08 de outubro de

2008 e ao Decreto n.º 6.899 de 15 de Julho de 2009, determinando os parâmetros de criação, experimentação e ensino, versando sobre os mais diversos temas, tais como: comissões de ética – CEUAs, credenciamento de instituições, diretrizes para a prática da eutanásia, instruções sobre estrutura física de instalações de criação e experimentação, métodos alternativos, diretrizes de boas práticas de produção e manutenção, guia brasileiro de produção, manutenção e utilização de animais em ensino e pesquisa, contemplando, roedores, lagomorfos, anfíbios, serpentes, primatas não humanos e peixes, responsabilidade técnica do biotério entre outros temas.

Conselho Nacional de Controle a Experimentação Animal - Dispõem sobre temas diversos ligados a criação animal, experimentação animal e o uso de animais em ensino.

As Resoluções Normativas (RN) elaboradas pelo CONCEA normatizam o uso de animais em pesquisa e ensino de forma mais técnica, dando as bases para o cumprimento da Lei n.º 11.794 de 08 de outubro de 2008 e ao Decreto n.º 6.899 de 15 de Julho de 2009, determinando os parâmetros de criação, experimentação e ensino, versando sobre os mais diversos temas, tais como: comissões de ética – CEUAs, credenciamento de instituições, diretrizes para a prática da eutanásia, instruções sobre estrutura física de instalações de criação e experimentação, métodos alternativos, diretrizes de boas práticas de produção e manutenção, guia brasileiro de produção, manutenção e utilização de animais em ensino e pesquisa, contemplando, roedores, lagomorfos, anfíbios, serpentes, primatas não humanos e peixes, responsabilidade técnica do biotério entre outros temas.

Capítulo 3. O princípio dos 3 Rs

No século XX, em 1954, Charles Hume, fundador da UFAW (“Universities Federation for Animal Welfare”), foi o primeiro a usar a expressão bem-estar animal. A sua preocupação com o sofrimento animal resultou na primeira edição da UFAW sobre o cuidado e manejo de animais de laboratório “Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals”, em 1947.

Desta forma, a Federação das universidades para o bem-estar animal (UFAW) decidiu patrocinar a pesquisa sistemática sobre o progresso de técnicas humanitárias no laboratório. Para desenvolver esses estudos relacionados às técnicas “humanitárias” em experimentos realizados com animais, Hume indicou o zoologista William M. S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch, que efetuaram um estudo sistemático de técnicas laboratoriais com foco em seus aspectos éticos. Em 1956, este trabalho resultou em um relatório geral para as comissões da Federação e, posteriormente, originou o livro intitulado Princípios das Técnicas Experimentais Humanitárias (“The Principles of Humane Experimental Technique”), concluído no início de 1958 e publicado por Russell e Burch em 1959.

Assim, em 1959, baseado no livro “The Principles of Humane Experimental Technique”, Russell e Burch preconizaram o princípio dos 3 Rs, Replacement, Reduction e Refinement, em nossa língua pátria 2Rs 1S (Redução, Refinamento e substituição)., Substituição (não usar animais quando puderem ser substituídos), Redução (redução do número de animais utilizados) e Refinamento (preocupação com o processo de refinamento das técnicas utilizadas na experimentação e o bem-estar animal).

O significado dos 3Rs[4]

Replacement (Substituir)	Refere-se à busca incessante para substituir uso de animal de laboratório por ações alternativas sempre que possível. Tais ações podem ser programas complexos de computador, cultura de células, voluntariado humano etc.
Replacement (Substituir)	Refere-se à busca incessante para substituir uso de animal de laboratório por ações alternativas sempre que possível. Tais ações podem ser programas complexos de computador, cultura de células, voluntariado humano etc.
Refinement (Refinamento)	Estudo e renovação constantes de estratégias que busquem aliviar e minimizar qualquer desconforto ao animal. Essa ideia passa por aplicação de técnicas cada vez menos invasivas.

A substituição é um grande desafio da CAL, são vários anos de estudo para que ocorra a validação do método. O método HET-CAM (Ensaios da membrana cório-alantóide) por exemplo baseia-se na avaliação de alterações vasculares ocorridas na membrana cório-alantóide de ovos embrionados de galinha quando expostas a uma substância teste. “Essa substância é colocada em contato com a membrana do ovo e em seguida as lesões são observadas e graduadas segundo escala pré-determinada” percebe-se que não se deixou de usar animais, porém usou-se outro tipo de cordados, não mamíferos e em fase de desenvolvimento que é incompatível com desenvolvimento da percepção de dor e sofrimento.

Apesar de queremos muito a substituição de animais em experimentos, é fato que a total substituição depende muito dos protocolos, objetivos e do que se vai pesquisar para determinar o tempo de validação do método, modelos anatômicos para estudo são sempre bem-vindos para evitar o uso de animais.

Capítulo 4 . Os animais de laboratório

Como vimos anteriormente, os animais de laboratório estão ligados às pesquisas na área da saúde desde sempre, elucidando vias de transmissão de doenças infecciosas, parasitárias, mecanismos e tratamentos de doenças crônicas como o câncer, diabetes e obesidade, além de vir colaborando decisivamente no desenvolvimento de novas vacinas. Toda a importância dos biomodelos animais para a saúde humana e animal nos leva à reflexão sobre o que são animais de laboratório em uma perspectiva conceitual.

A DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA – DBCA de 2016 afirma que os animais de laboratório são biomodelos com características sanitárias e genéticas definidas, adaptados e/ou produzidos, mantidos e/ou manipulados de forma experimental ou observacional em instalações destinadas à investigação científica.

A importância e a contribuição dos animais de laboratório são incalculáveis para a evolução do conhecimento científico. Entretanto, para que os resultados sejam fidedignos e reprodutíveis, há necessidade da escolha do modelo animal, bem como o sistema de criação ideal para cada modelo escolhido. Diversas espécies de animais são utilizadas nas pesquisas biomédicas, tais como sapos, rãs, peixes, aves, roedores, coelhos, cães, gatos e primatas não-humanos. Cada uma destas espécies possui características anatômicas, fisiológicas e comportamentais específicas que devem ser respeitadas para a garantia do bem-estar animal.

4 Princípio dos 3 Rs - https://ceua.unifesp.br/ https://ceua.unifesp.br/projetos/material-de-apoio/principios-dos-3rs

Desta forma, considerando a diversidade e características intrínsecas de cada modelo animal, é importante evitar a generalização dos resultados obtidos, uma vez que, nem todo o resultado poderá ser extrapolado para a espécie humana. O animal de laboratório é considerado um reagente biológico, que depende de fatores ambientais controlados e estáveis para garantir a reprodutibilidade dos resultados experimentais. Assim, para garantir um bom resultado experimental, a escolha do modelo animal deve considerar a espécie que mais se aproxime de resposta do homem, além da facilidade de manejo.

Os roedores (ratos e camundongos) são os modelos animais mais utilizados até hoje na pesquisa cientifica, porque atendem algumas características desejáveis como: tamanho reduzido, ciclo reprodutivo curto, prole numerosa, precocidade, nutrição variada e adaptação ao cativeiro. Além destas características mencionadas ainda apresentam outras, tais como: docilidade, fácil manuseio, adaptação a ambientes variados e sociabilidade. Outras características foram adquiridas ou fixadas, ao longo da sua utilização, como o albinismo, que possibilita a marcação e visualização de experimentos realizados na pele. É preciso que se esclareça que o albinismo existe na natureza, mas o indivíduo portador é mais facilmente localizado pelos predadores naturais e dificilmente chega à idade reprodutiva, de forma que a característica não é passada à geração seguinte (SANTOS, 2006).

Considerando que os roedores são os modelos animais mais estudados, a manipulação genética foi um grande avanço, e hoje, obedecendo ainda ao conceito de modelo animal, podemos dispor de animais muito mais adequados, já que seu genoma é resultante de acasalamentos dirigidos e controlados, podendo ativar ou inibir um gene para obter uma determinada proteína ou característica desejada. Atualmente o grau de sofisticação é tanto que se pode afirmar existir, para cada experimento realizado, um modelo cuja resposta é a mais adequada, como ocorreu durante a pandemia, os modelos murinos desenvolvidos para os estudos com o vírus sarcov-2, agente etiológico da covid 19.

Atualmente existem ferramentas de edição de genomas, como CRISPR/Cas9, são muito eficientes na construção de modelos animais, como por exemplo na produção de animais nocaute KO (KNOCKOUT) para estudo de determinado gene em alguma patologia existente em humanos e não humanos. Pelo exposto, pode-se observar que a jovem ciência em animais de laboratório está em constante evolução e exigindo cada vez mais investimento e capacitação dos profissionais que atuam na área.

Desafios na produção e experimentação com biomodelos

Os principais desafios para as instituições de pesquisa públicas estão no âmbito legal e financeiro. É importante destacar que o aspecto financeiro também impacta na atualização profissional. Além disso, também impacta na implantação de estruturas modernas a exemplo dos micro-isoladores, módulos de troca e autoclave de dupla porta. Essas limitações fazem com que as instituições precisem se adaptar com os recursos e materiais que possuem e nem sempre estes atendem totalmente a exigência dos protocolos ali executados. Assim, a implantação de biomodelos para estudos específicos, como por exemplo o camundongo NUDE, é inviabilizada dependendo da estrutura de micro e microambientes disponíveis para esta espécie.

Como é possível perceber, todos os maiores desafios para dos recursos humanos ancorados direta ou indiretamente na pesquisa com animais de laboratório, o conhecimento é a base de tudo: Na hora de construir um biotério desde o alicerce, na hora da instalação elétrica (pensando nos equipamentos que ali serão instalados), os animais alocados naquela estrutura X demanda institucional/local e claro o aperfeiçoamento de protocolos de produção e/ou experimentação.

UNIDADE 2. INSTALAÇÃO ANIMAL, BARREIRAS SANITÁRIAS E BIOSSEGURANÇA

Capítulo 1. Estrutura física e classificação de Biotérios

Biotério era anteriormente uma palavra associada a um local onde são criados e/ou mantidos animais vivos de qualquer espécie destinados à pesquisa científica, geralmente localizados em universidades e centros de pesquisa. A ideia de que **é** um prédio onde são mantidos ratos para pesquisas ainda resiste em alguns lugares, mesmo o conceito de biotério tendo sido atualizado pelo CONCEA. Desde a homologação da desde a Lei 11.794/2008, o termo "biotério" foi substituído pela palavra "Instalação" e é citado em todas as Resoluções Normativas publicadas pelo CONCEA.

A resolução Normativa nº22 (25/06/2015) possui um glossário de palavras utilizados em Ciências em Animais de Laboratório e conceitua "Instalação animal" e dá como exemplos: instalações para roedores e lagomorfos, fazendas experimentais, canil, pocilga, baia, piquete, curral, galpão, granja, tanque ou lagos para peixes, viveiros, etc.

O importante a ser lembrado, quando se quer entender o conceito de instalação animal ou biotério, é qual a função daqueles animais mantidos naquela instalação e não somente levar em consideração a infraestrutura onde esses são mantidos. Assim, uma fazenda modelo de uma determinada universidade, que é utilizada para aulas práticas dos alunos de medicina veterinária e zootecnia, por exemplo, é considerada uma instalação animal pelo CONCEA. Da mesma forma que uma granja que utiliza frangos para realizar pesquisa em melhoramento animal ou desempenho de uma nova ração industrializada.

Classificação das instalações animais

As instalações animais são classificadas segundo sua finalidade ou objetivo de permanência da espécie naquela instalação. Assim, são classificadas em instalações de criação ou produção manutenção, experimentação ou utilização.

Instalação de criação ou produção - Local adequado onde são desenvolvidas as atividades de reprodução e criação de espécies animais para fins de ensino ou de pesquisa científica. Estas instalações mantêm as matrizes reprodutoras de várias espécies e linhagens de animais de laboratório e requerem vários ambientes, divididos conforme as funções na criação.

Instalações de manutenção - **São aquelas onde os animais permanecem desde a sua saída da instalação de produção até o momento da utilização no ensino ou pesquisa. É o local de adaptação do animal, portanto é importante que seja um ambiente que ofereça condições necessárias para a manutenção do bem-estar da espécie animal.**

Instalações de experimentação ou utilização - **São locais onde são realizadas as atividades de**

ensino ou da pesquisa científica.

O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) é órgão integrante do Ministério da Ciência e Tecnologia, constituindo-se em instância colegiada multidisciplinar de caráter normativo, consultivo, deliberativo e recursal. Dentre as suas competências destacam-se a formulação de normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica, bem como estabelecer procedimentos para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal. O Conselho é responsável também pelo credenciamento das instituições que desenvolvam atividades nesta área, além de administrar o cadastro de protocolos experimentais ou pedagógicos aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica realizados ou em andamento no País. (http://www.sbcal.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=410

Todos os animais mantidos em instalações animais de pesquisa devem, obrigatoriamente, possuir ficha de identificação¿. Essas fichas devem estar visíveis em seus recintos, com informações sobre o tipo de pesquisa, agente infeccioso, protocolos que estão sendo utilizados, além da identificação e contato do coordenador da pesquisa

Há várias Resoluções Normativas do CONCEA que indicam como devem ser construídas as infraestruturas de biotérios: RN 15 CONCEA para roedores e lagomorfos ; RN 28 para primatas não humanos ; RN 29 para anfíbios e serpentes ; RN 41 para cães e gatos ; RN 42 para equídeos ; RN 44 para peixes.

Todas as instituições cadastradas no CONCEA, por meio do Cadastro de Instituições de Uso Científico de Animais – CIUCA, devem seguir essas regras em novas construções, e as que já tiverem instalações construídas antes da publicação das legislações, devem adequá-las.

Capítulo 2. Instalações e Barreiras Sanitárias

Quando pensamos em estrutura física e nos procedimentos realizados em uma instalação animal de criação ou de pesquisa de animais de laboratório, o zelo deve ser constante, com foco na manutenção de animais com *status* sanitário desejável a uma experimentação realizada com responsabilidade e, portanto, de resultados confiáveis e reprodutível, mas também com atenção ao bem-estar animal.

As instalações para animais de laboratório, sejam para criação ou experimentação, devem ser planejadas e construídas de forma a atender certos quesitos básicos que proporcionem as condições necessárias à produção e/ou à experimentação animal, as quais estão determinadas na Resolução Normativa nº15 que trata da “Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos”.

Também deve obedecer a outros instrumentos legais (Lei, Portarias, Resoluções) de órgãos como o CTNBio, por meio da Instrução Normativa CTNBio nº 12 de 27.05.98, por exemplo , e Lei nº 11105/2005, que citam adequações para níveis biológicos de experimentação e cuidados construtivos na criação e manutenção de animais transgênicos.

Portanto, a elaboração de projetos de construção e reforma e o planejamento de biotérios devem ser cuidadosamente realizados de acordo com a finalidade das atividades a serem desenvolvidas e de acordo

com o nível biológico de experimentação animal que será realizado no biotério, contando com um grupo multidisciplinar que se atenha ao planejamento arquitetônico e que conheça bem os detalhes dos procedimentos de operacionalização e práticas de biossegurança.

O ideal é que as instalações para experimentação de animais de laboratório sejam fisicamente distantes de outros laboratórios e instalações de criação a fim não só de resguardar a proteção de animais e pessoas. Essas instalações devem ser construídas visando a facilidade de limpeza, desinfecção e manutenção, pois a observação destes fatores é que mantém as barreiras sanitárias.

Barreiras sanitárias são um conjunto de intervenções, que junto com a instalação de equipamentos e obediência a procedimentos, buscam o controle das condições ambientais das áreas internas do biotério e a minimização das probabilidades de contaminação. As barreiras sanitárias podem ser primárias e secundárias, mas é o cuidado conjunto com ambas que garante a manutenção do *status* sanitário dos animais e impede que ocorra alguma contaminação ambiental ou problema de saúde para o trabalhador da instalação ou pessoas na região próxima ao prédio.

Equipamentos de segurança são considerados barreiras primárias e referem-se aos vários tipos de equipamentos de proteção individual (EPI) e coletiva (EPC) utilizados no interior dos biotérios de criação, para manter os animais hígidos, e de biotérios de experimentação, para evitar a contaminação e a liberação de contaminantes biológicos, químicos ou radiológicos.

Cabines de segurança biológica (CSB) e módulos de troca de animais, assim como outros dispositivos e/ou equipamentos de contenção física, tais como respiradores, protetores faciais, são usados ao conduzir procedimentos que apresentem um alto potencial de criação de aerossóis e devem estar ligadas ao sistema de emergência, no caso de falhas no fornecimento de energia.

Barreiras secundárias

Já as barreiras secundárias são as próprias instalações e seus detalhes construtivos: portas, pisos, caixa de passagem (*pass troughs*), restrição de acesso, corredores unidirecionais etc. Como já citado, o cuidado na construção e manutenção das estruturas da instalação é que farão com que elas sejam eficientes.

É muito importante você compreender que a finalidade das barreiras sanitárias é realizar contenção ou eliminação da exposição à agente de risco para a saúde tanto dos animais quanto do pessoal, bem como do ambiente laboratorial e do ambiente externo à instalação.

Capítulo 3. Biossegurança em Biotérios

As boas práticas são um conjunto de normas que objetivam a qualidade dos produtos e resultados de pesquisa científicas. Em laboratórios, as Boas Práticas, também conhecidas como BPL, são reconhecidas como norteadoras de um padrão de qualidade que deve ser alcançado e prevê a implantação de um sistema de qualidade, onde as normas são constantemente avaliadas e aplicadas de acordo com a característica do laboratório. Em biotérios, as Boas Práticas incluem desde uma boa higiene pessoal do quem maneja os

animais até a implantação de fluxos de tráfego, planos de emergência e para descartes de resíduos. Todas as instruções e descrições de atividades da rotina devem ser padronizadas, detalhadas e documentadas no documento chamado de Procedimento Operacional Padrão (POP).

Não é muito fácil assimilar várias regras e normas em um ambiente de biotério. Por isso, é essencial o treinamento constante das pessoas envolvidas e a elaboração de POP, documento formatado como manual descritivo para a execução de tarefas e procedimentos, para que todos possam realizar as mesmas tarefas de forma padronizada.

Para que o iniciante assimile cada Procedimento Operacional Padrão (POP) é necessário que estes fiquem às vistas e acessíveis a todos e que contenham o passo-a-passo, em linguagem bem simplificada e, se possível, de forma ilustrada, sobre o procedimento a ser realizado naquela área. É importante registrar que **é natural que** alguns processos ou procedimentos sofram alterações, por esse motivo todos os POPs precisam passar por revisões e atualizações periódicas.

Um dos POPs mais importantes a serem seguidos em biotérios e que garantem a manutenção das **barreiras sanitárias** é o POP de higiene pessoal e paramentação em áreas internas do biotério.

Aquelas regrinhas básicas sobre lavar as mãos, escovar os dentes e manter as roupas limpas aqui ganham mais detalhes e são os primeiros que devem ser assimilados pelos técnicos de biotério.

As Boas práticas em biotério não incluem somente a obediência aos POPs. É importante e necessária a inclusão de um programa periódico de treinamento pessoal, atualização de vacinas obrigatórias, sinalização de áreas de riscos, planos de emergência e para descarte de resíduos são outros pontos muito importantes para manutenção da qualidade no biotério.

De acordo com o nível de exposição de cada agente biológico pesquisado no interior do biotério, temos uma classificação de risco, o qual é determinada por organismos internacionais de saúde e pelo Ministério da Saúde, levando em consideração o risco individual e coletivo do microrganismo estudado.

Os níveis de biossegurança e medidas de contenção a serem adotadas, devem considerar a espécie animal, o risco potencial do agente, as atividades da instalação animal e as condicionantes locais (da SILVA, ,2018).

São quatro os níveis de biossegurança, assim em equivalência aos níveis de segurança de trabalho em laboratório (NB 1, 2, 3 e 4), os Níveis de Biossegurança para o trabalho com animais (NBA) possuem quatro níveis de biossegurança (NBA-1, NBA-2, NB-2, NBA-4). Quanto maior o nível, mais perigoso é o microrganismo em relação à saúde individual, de quem manipula os animais, e à saúde coletiva.

Capítulo 4. Biologia e Manejo de camundongos

Os camundongos são roedores originários da Ásia e pela proximidade aos humanos pela fácil obtenção de comida, se espalharam por todos os continentes. Seu nome científico é *mus musculus.*

Os camundongos foram introduzidos na pesquisa científica por volta de 1600, mas só no século XIX tornaram-se grandes protagonistas nos laboratórios de pesquisa, graças aos estudos do “pai da genética”, **Gregor Mendel**.

As primeiras linhagens consanguíneas, também chamados de animais homozigotos ou *inbred,* foram obtidos pelo acasalamento entre irmãos e/ou pais e filhos durante vinte ou mais gerações consecutivas. Esse tipo de acasalamento em colônias de roedores, torna os animais quase idênticos, obtendo um Índice de homozigose em torno de 99%. Nas linhagens consanguíneas, para que a homozigose seja mantida nas gerações seguintes, os reprodutores devem ser acasalados indefinidamente, entre irmãos ou pais e filhos de aumentando a chance de fixação das mutações, constituindo, assim, as linhagens congênitas. Estas linhagens de animais *inbreed* surgiram no começo do século XX, em 1907, com os estudos,na universidade de Harvard, do geneticista americano **Clarence Cook Little.**

Os esforços pioneiros de endogamia do Dr. Little resultaram em duas linhagens endogâmicas altamente bem-sucedidas. Em estudos estudo sobre pelagens, conseguiu fixar um gene recessivo para cor marrom não agouti, criando a primeira linhagem consanguínea, a qual chamou de DBA (*The dilute Brown* ou marrom diluído). Depois desse acontecimento, várias outras linhagens importantes para pesquisa científica foram criadas como: C57BL/6, Balb/c, C3H, C57BL/10 e CBA.



?

Figura 1-Exemplos de linhagens consanguíneas. A- C57Bl/6. B- DBA. C- Balb/c Fonte: The Jackson Laboratory, 2021

Entre as diversas características favoráveis à utilização desses animais podemos destacar que são pequenos, muito prolíferos, têm o período de gestação curto, são dóceis, têm curto período de vida e informações genéticas bem conhecidas. Além disso, quando comparados à outras espécies de laboratório, apresentam baixo custo de manutenção. Por todas essas razões, atualmente, a maioria das pesquisas envolvendo animais são realizadas com esse biomodelos em estudos de oncologia, genética, virologia, teratologia, entre outros (LAPCHIK; MATTARAIA; MI KO, 2017).

Saiba mais sobre o assunto

Linhagens do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB)

O ICTB é uma unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), que entre suas diversas funções, possui uma área específica para produção de camundongos localizada no Serviço de Criação de Roedores e Lagomorfos (SCRL). Essa área têm um padrão de criação muito controlado para manter animais livre de patógenos específicos (SPF).

Atualmente (2021) possui 51 linhagens que atendem às demandas dos pesquisadores da Fiocruz para estudos científicos, controle de qualidade e desenvolvimentos tecnológicos na área da saúde pública.

Reprodução

As instalações para animais de pesquisa são rigorosamente controladas, o que possibilita a reprodução dos camundongos ao longo de todo ano. As fêmeas são poliéstricas, com **ciclo estral** de 4 a 5 dias.

Após o início do estro, a ovulação ocorre dentro de 8 a 12 horas e em geral, as fêmeas apresentam cio pós-parto dentro de 14 a 28 horas. Caso o macho seja mantido com a fêmea durante toda a lactação, poderá ocorrer cobertura no pós-parto, sendo importante manejar o desmame corretamente para que os lactentes mais velhos não pisoteiem os neonatos.

Esses animais têm comportamento reprodutivo bem descrito, e ocorre durante a noite, sendo dividido em perseguição da fêmea pelo macho (cheirando principalmente a área genital das fêmeas), montagem do macho na fêmea, aceite pela fêmea, intromissão (repete o ato por várias vezes) e autolimpeza das genitália para o próximo acasalamento (LAPCHIK; MATTARAIA; MI KO, 2017).

Os camundongos atingem a maturidade sexual 6 a 8 semanas após o nascimento. Em geral, recomenda-se acasalamento com 8 semanas de idade, dado que fêmeas mais novas podem gerar lactentes menores

Após o acasalamento, entre 16 e 24 horas após a cópula, ocorre a formação de um plug vaginal, que nada mais é do que um tampão ou um denso coágulo que se forma pelos fluidos seminais e fecha o lúmen vaginal. A presença do plug vaginal é comprobatória do acasalamento bem-sucedido.



Figura 2- Plug Vaginal ou plug seminal uma massa branca e firme localizada na região vaginal da fêmea. Fonte: Neves, 2013 p.60

Uma outra característica da espécie que deve ser conhecida e que pode auxiliar o manejo reprodutivo é o conhecimento dos efeitos dos **feromônios.**

Os feromônios são sustâncias químicas liberadas por machos e fêmeas que podem influenciar o comportamento reprodutivo dos camundongos. Dentre seus efeitos podemos citar:

Efeito Lee-Boot

Quando muitas fêmeas são acondicionadas conjuntamente, sem a presença do macho. Elas entram em **anestro** [período de completa inatividade sexual, durante o qual não há sinais de manifestação de cio], diestro prolongado ou pseudoprenhez

Efeito Whitten

Após esse período de anestro, quando as fêmeas são expostas a um macho ou seus odores e começam a ovular após aproximadamente 48 horas

Efeito Bruce

Quando uma fêmea gestante é exposta a um macho diferente daquele acasalado anteriormente. Dentro de até 4 dias após o acasalamento, poderá ocorrer a morte dos embriões que ela carregava.

Normalmente, o período de gestão desses animais é de 19 a 21 dias. Recomenda-se que a maioria dos reprodutores sejam mantidos nas colônias de reprodução até os 8 meses de idade, apesar de terem período médio de vida de 2 anos, com vistas a maximizar a produção. Nesse período as fêmeas podem ter de 3 a 7 ninhadas, com a médias de 4 a 12 lactentes. A linhagens não consanguíneas costumam ter um número maior de filhotes, com média de 8 a 10 lactentes, já os animais consanguíneos têm em média 5 lactentes.

A fêmeas possuem 5 pares de tetas. Quando estão perto de parir constroem ninhos e comumente parem no período da manhã. Como nem sempre é o possível testemunhar o parto, é importante conhecer as características dos neonatos no dia a dia do seu desenvolvimento para melhor datarmos o dia do parto.

Os lactentes nascem com olhos fechados, sem pelos, com o corpo avermelhado e o pavilhão auricular fechado. Pesam aproximadamente 1 g ao nascimento.

Com um dia de vida é possível observar o leite no estomago e a vermelhidão do corpo é reduzida.

Com dois dias de vida reduzem ainda mais a tonalidade de vermelho do corpo, podendo começar a surgir a coloração de algumas linhagens. A orelha começa a apontar.

Aos três dias é possível observar a orelha começar a descolar da cabeça. Aos quatro dias a orelha descola completamente da cabeça. Com sete dias o corpo está completamente cheio de pelo e as tetas são visíveis. Com 10 dias abrem os olhos e com doze dias começam a comer alimento sólido.

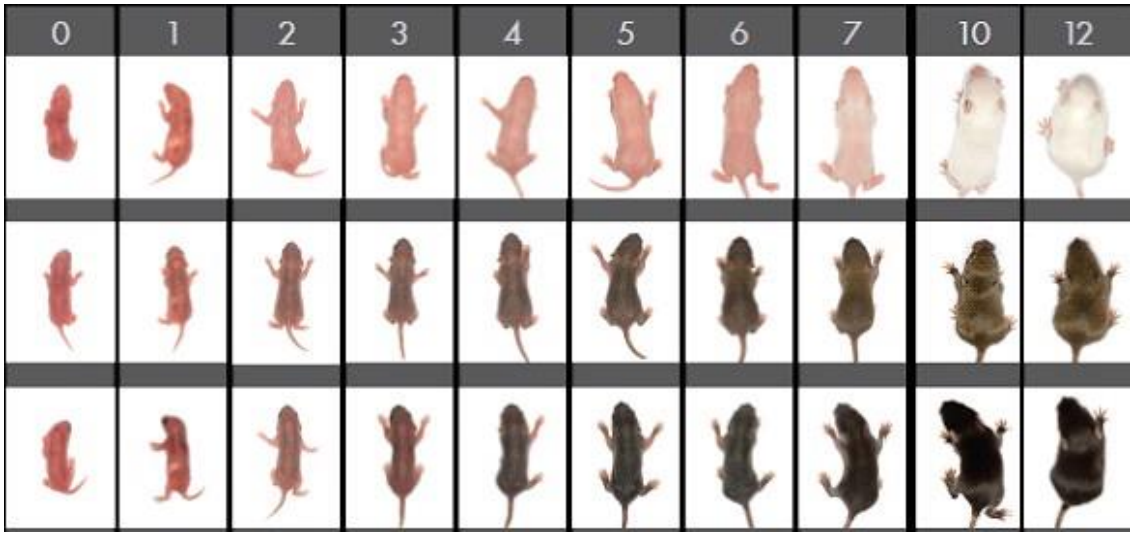


Figura 3- Características dos lactentes de acordo com a idade de nascimento. Fonte: The Jackson laboratory, 2021

Em média os lactentes podem ser desmamados entre 18 e 21dias de nascidos. Deve-se sempre ter em mente as peculiaridades de cada linhagem, pois existem linhagens que desenvolvem mais rápido, sendo possível adiantar o desmame, como no caso do *Swiss Webster*. Muitos lactantes dessa linhagem aos 18 dias já estão aptos para desmame. No entanto, outras linhagens precisam de mais atenção e podem ser desmamadas mais tardiamente, como no caso do C57BL/6, os quais podem ser desmamados aos 28 dias, pois são animais menores e que por vezes precisam de mais tempo de suporte de amamentação da mãe, evitando morte após desmame.

Como regra, é importante a desmama das fêmeas grávidas no período padrão de lactação (21 dias) ou mesmo precocemente (quando necessário), para evitar a morte dos neonatos por pisoteio dos filhotes mais velhos. Todo esse processo deve ser acompanho de perto pelo técnico responsável, atentando ao conhecimento da linhagem com a qual trabalha.

Sexagem após o nascimento

Para separar e identificar se os camundongos são machos ou fêmeas deve-se realizar a sexagem após o nascimento. Para isso, realiza-se a observação da papila genital e a distância ano-genital, que no macho é maior que na fêmea.

No desmame e na vida adulta é possível ver a bolsa escrotal e pelos entre o ânus e a região do pênis. Já as fêmeas possuem uma região sem pelos entre a vulva e o ânus, sendo esta distância mais curta nesta área. Uma boa prática é a conferência do sexo dos animais a cada troca de gaiolas, para evitar a manutenção indesejada de animais de sexos diferentes na mesma gaiola.

Quando o pesquisador precisa saber a idade exata de gestação, costumamos realizar o acasalamento de um grupo de camundongos e observar a presença do plug vaginal. Então, após introduzir a fêmea na gaiola do macho, geralmente no período da tarde, observamos dia após dia, pela manhã, a presença do plug vaginal. Ao encontrarmos o plug, datamos a cobertura e o desenvolvimento da gestação, tendo como dia 0 o dia da observação do plug.

Por que é importante saber sobre a quantidade de tetas?

Sabe-se que a fêmea de camundongo possui 10 tetas, essa informação não parece muito relevante, mas para o bom desenvolvimento da ninhada, recomenda-se manter com a mãe apenas o número de filhotes que ela conseguirá amamentar adequadamente. Por vezes, dependendo da linhagem, quando nascem mais de 10 lactentes, deve-se transferi-los para outras fêmeas de parturição próxima. Para isso, os lactentes a serem removidos devem receber o cheiro da mãe adotiva. Para isso, deve-se esfregar a urina da mãe adotiva e um pouco da cama ou ninho dos camundongos da nova caixa que irá receber os animais, no corpo dos neonatos. Importante lembrar que algumas linhagens não adotam bem outros lactentes, então o técnico deve estar atento as características das linhagens com a qual trabalha.

Classificação genética

Os camundongos de laboratório são diferenciados de acordo com seu *status* genético. Seguem as principais classificações:

- **Não consanguíneos, *Outbred* ou heterogênicos**

As populações naturais apresentam diferenças genéticas e respondem de maneira diferente a doenças e tratamentos. Os animais não consanguíneos mimetizam essas populações naturais, assim, os camundongos *outbred* apresentam grande variabilidade genética, o que os torna mais parecidos com as populações humanas. Tais características possibilitam maior resistência, maiores ninhadas, menores taxas de mortalidade e fertilidade. Como exemplo dessas linhagens temos: Swiss Webster, NIH Swiss e Diversity Outbred (ANDRADE, 2002; LAPCHIK; MATTARAIA; MI KO, 2017; WANNER, 2018).



- **Consanguíneos, *Inbred* ou Isogênicos**

Essas linhagens são geradas por meio do acasalamento de irmãos com irmãos ou entre pais e filhos, durante pelo menos 20 gerações. Os animais *inbred* são originários de um único casal ancestral, o que lhes garante grandes semelhanças genéticas, chegando a 99% de taxa de homozigose.

Existe uma grande variedade de cepa isogênicas (Ex.: CBA, DBA/1; C57BL/6 e Balb/c), que podem ser utilizadas em vários campos da pesquisa, como por exemplo: imunologia, alcoolismo, hipertensão, diabetes e doença de Alzheimer.

Existem ainda os camundongos híbridos, os quais são produzidos pelo acasalamento de duas linhagens consanguíneas diferentes (ex: fêmea C57Bl/6 X macho DBA/2 = filhote B6D2F1). Dessa maneira, esses animais são heterozigotos, apresentando um alelo de cada progenitor. São os chamados animais híbridos F1.

- **Animais Geneticamente Modificados (AnGM)**

Animais geneticamente modificados são aqueles que tiveram seus genomas alterados por meio de técnicas de engenharia genética. Estas alterações podem ser determinadas pela introdução, modificação ou inativação de um ou mais genes. Assim, com a utilização de novas tecnologias genéticas foi possível alterar o genoma dos animais, criando milhares de novos modelos para o estudo de diversas patologias humanas.

Denominamos ***knockout*** linhagens que sofreram a inativação ou deleção de um ou mais genes e de **transgênicos** os animais que tiveram introduzidos no seu DNA um gene ou mais que não faziam parte do seu material genético.

Classificação Sanitária

Os camundongos de laboratório têm diferentes classificações de acordo com a microbiota que compõe o seu organismo. Algumas formas de classificação são: *germfree*, gnotobióticos, livres de patógenos específicos (SPF) e convencionais. Esse *status* influencia diretamente o tipo de barreira sanitária que será utilizada na sua manutenção.

- **Animais *germfree* ou axênicos**

Esses camundongos são livres de qualquer microrganismo associado, inclusive de microrganismos intestinais. Para obter animais *germfree* é necessária a realização de cesárea asséptica ou transferência de embriões e uso de isoladores, o manejo deve ser rígido, de forma a garantir a manutenção desse *status* sanitário.

- **Gnotobióticos**

Esses camundongos são os animais *germfree* onde foram incluídos uma microbiota conhecida (definida), podendo-se utilizar um ou mais microrganismos. Assim como com os animais *germfree*, esses devem ser mantidos com alto nível de controle sanitário, em isoladores.

- **Animais Livres de Patógenos Específicos (SPF)**

São camundongo que não devem apresentar em sua microbiota uma série de patógenos definidos em uma listagem de microrganismos e parasitos, com o objetivo de minimizarmos alterações nas pesquisas em que estão envolvidos. São chamados comumente de animais SPF (Specific-pathogen-free). Esse *status* sanitário deve ser periodicamente confirmado por uma série de testes laboratoriais

- **Convencionais**

São animais produzidos sem maior controle sanitário. Os microrganismos associados são desconhecidos, podendo apresentar microrganismos patogênicos e não patogênicos. São normalmente mantidos em ambientes com menores níveis de barreiras sanitárias.

Alimentação

A nutrição dos camundongos de laboratório normalmente ocorre por meio da ração industrializada. Os parâmetros nutricionais são definidos de acordo com tabelas nutricionais publicadas para a espécie.

Animais mantidos sob barreiras sanitárias estritas alimentam-se de rações descontaminadas ou esterilizadas. Geralmente, essa descontaminação dá-se de uma das duas formas: irradiação gama ou autoclavagem. É importante sempre ter em mente que os métodos de descontaminação e a exposição por longos períodos dessas rações nos comedouros ou mesmo nas embalagens originais, levam a perdas de nutrientes, especialmente de vitaminas.

A falta de nutrientes, a formulação inadequada das rações ou ainda problemas na estocagem ou na esterilização da dieta podem acarretar problemas no desenvolvimento dos animais, perda de pelos, baixo peso, obesidade e baixo desempenho reprodutivo.

O consumo de ração pelo biotério deve ser bem calculado, de forma a evitar-se estocagem além do necessário ou a falta de alimento. As datas de validade dos produtos devem ser bem controladas e o local de estoque deve contar com controle de temperatura, umidade, vetores e roedores.

A disponibilidade de água fresca e potável acorre por meio de bebedouros e deve ser oferecida *ad libitum* **(à vontade)· Um animal adulto consume aproximadamente 5 a 10 ml por dia** (LAPCHIK; MATTARAIA; MI KO, 2017) e o consumo de água influencia o consumo de ração. Deve-se sempre tomar bastante cuidado com a fonte de água, uma vez que a água pode ser grande veiculador de contaminação aos camundongos. Muitos biotérios filtram, acidificam e mesmo autoclavam a água servida aos camundongos.

Manejo

Existem diversas questões que devem ser levadas em consideração no manejo dos animais: a contenção, o alojamento e o tipo de colônia. O bom manejo dos animais garante a qualidade genética e sanitária, além do bem-estar dos animais.De uma forma geral, há três tipos de colônias em um biotério de criação. São elas: fundação, expansão e produção.

- **Colônia de fundação ou piloto**

É a primeira colônia a ser formada e dá origem a todas as outras· Esta colônia autoperpetua-se e tem como função principal manter as características genéticas dos animais de origem· São mantidos em acasalamentos monogâmicos permanentes, para registro e identificação dos dados zootécnicos (intervalo entre partos, número de filhotes nascidos/fêmea, número de desmamados/fêmea). Nessa colônia de fundação os animais inbred são mantidos de 4 a 10 casais, visando manter a proximidade genética com um ancestral em comum enquanto os animais outbred são mantidos em muitos casais, para manter a variabilidade genética, utilizando-se um mínimo de 25 casais, com métodos de acasalamento específicos.

- **Colônia de Expansão**

Esta colônia é formada a partir de animais que vieram da colônia de fundação, tendo como finalidade ampliar a produção de matrizes, já que as colônias de fundação consanguíneas têm reduzido número de casais. Neste caso, pode ser utilizado o sistema de acasalamento monogâmico ou poligâmico entre irmãos. A expansão de colônias heterogênicas só ocorre quando há uma demanda muito grande de animais para as

atividades científicas ou quando a colônia fundadora não tem condições de produzir todos os animais necessários e há necessidade de expandir a fundação para suprir a colônia de produção.

- **Colônia de Produção**

Esta colônia é criada para atender às demandas da pesquisa. Ela é formada por animais advindos da colônia de fundação e/ou expansão e pode ser mantida com acasalamentos ao acaso. Esta colônia deve ser bem dimensionada, de acordo com a previsão de uso da linhagem e suas características reprodutivas. No caso das colônias *outbred* os casais e/ou haréns são provenientes das colônias de fundação enquanto nas colônias *inbred* podem ser oriundos das colônias de fundação e/ou expansão. Deve-se avaliar aqui qual a melhor estratégia de acasalamento: se o acasalamento monogâmico ou poligâmico, permanente ou programado. Para pedidos esporádicos talvez o acasalamento programado atenda melhor que o permanente, mas cada caso deve ser isoladamente avaliado.

Contenção

A contenção é o momento de contato do técnico com os animais. Caso feita de maneira incorreta pode ocasionar estresse desnecessário aos camundongos.

A forma de contenção pode variar de acordo com o objetivo da atividade. Para manejo básico de troca de gaiola, pode-se erguer o animal pela base da cauda, com auxílio do dedo ou de uma pinça atraumática; utilizar as mãos formando uma concha ou ainda, utilizar um tubo de material descartável ou esterilizável para transferi-lo de maneira cuidadosa para a outra gaiola. Cada forma de contenção apresenta vantagens e desvantagens e deve ser definida com base nos objetivos do biotério.



Relação da área necessária para camundongos em grupos, de acordo com o peso corporal e área a ser destinada para fêmeas com lactentes. Fonte: Concea, 2013

Figura 5- Contenções para troca. A- Contenção com o dedo em forma de pinça. B- Contenção com pinça inox. C- Contenção com tubo de acrílico. Fonte: figura A e B - acervo do ICTB, 2021 e figura C - NC3Rs,2021

Alojamento

A resolução normativa do Concea Nº15 de 2013 regulamenta a estrutura física e ambientes de roedores e lagomorfos, determinando a área necessária para o alojamento dos camundongos em grupos ou para fêmeas com filhotes (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO, 2013).

Espécie		Peso (g)	Área/Animal (cm²)	Altura (cm)[A]	Observações
Camundongos	**Em grupos[B]**	<10	38,7	12,7	Animais maiores podem necessitar de maior espaço para adequado desenvolvimento.
		10 a 15	51,6	12,7	
		15 a 25	77,4	12,7	
		<25	>96,7	12,7	
	Fêmea com filhotes		300 (espaço para o grupo)	12,7	Avaliar o modo de reprodução, pois pode haver variações no número de adultos e filhotes, tamanho e idade dos animais.[C]
Ratos	**Em grupos[B]**	<100	109,6	17,8	Animais maiores podem necessitar de maior espaço para adequado desenvolvimento.
		100 a 200	148,35	17,8	
		200 a 300	187,05	17,8	
		300 a 400	258,0	17,8	
		400 a 500	387,0	17,8	
		>500	≥451,5	17,8	

No mercado, atualmente, existem diversos tipos de gaiolas para manutenção de camundongos, com dimensões distintas. Os animais devem ser alojados nestas gaiolas respeitando as quantidades determinadas na normativa do CONCEA.

As gaiolas devem ser sempre forradas com material de cama, o qual pode ser maravalha de pinus ou de Aspen, flocos de pinus ou Aspen, Xilana e outros materiais. A forração visa o conforto dos animais e a absorção da umidade da produção das excretas. A cama deve ser absorvente, livre de pó, não palatável, isolante térmica e sem contaminações químicas e microbiológicas. Recomenda-se a troca dos animais uma a duas vezes por semanas, dependendo da do tipo de cama empregado e da necessidade dos animais.

Identificação

Os camundongos podem ser identificados com o uso de canetas permanentes, raspagem do pelo, tinturas atóxicas, perfuração das orelhas, uso de brincos ou de microchips. Os dados dos animais devem ser registrados em uma ficha, onde será possível visualizar dados como data de nascimento, data de acasalamento, data do parto, linhagem, sexo, número de animais na gaiola e responsável pelos animais.

ICTB	Reservados da Colônia de Fundação Inbred Camundongos	Gaiola de Origem Nº:
Linhagem:		
Quantidade:	Sexo:	
Data de Nascimento:		
Data de Desmame:		
Observações:		
Responsável:	Rubrica:	

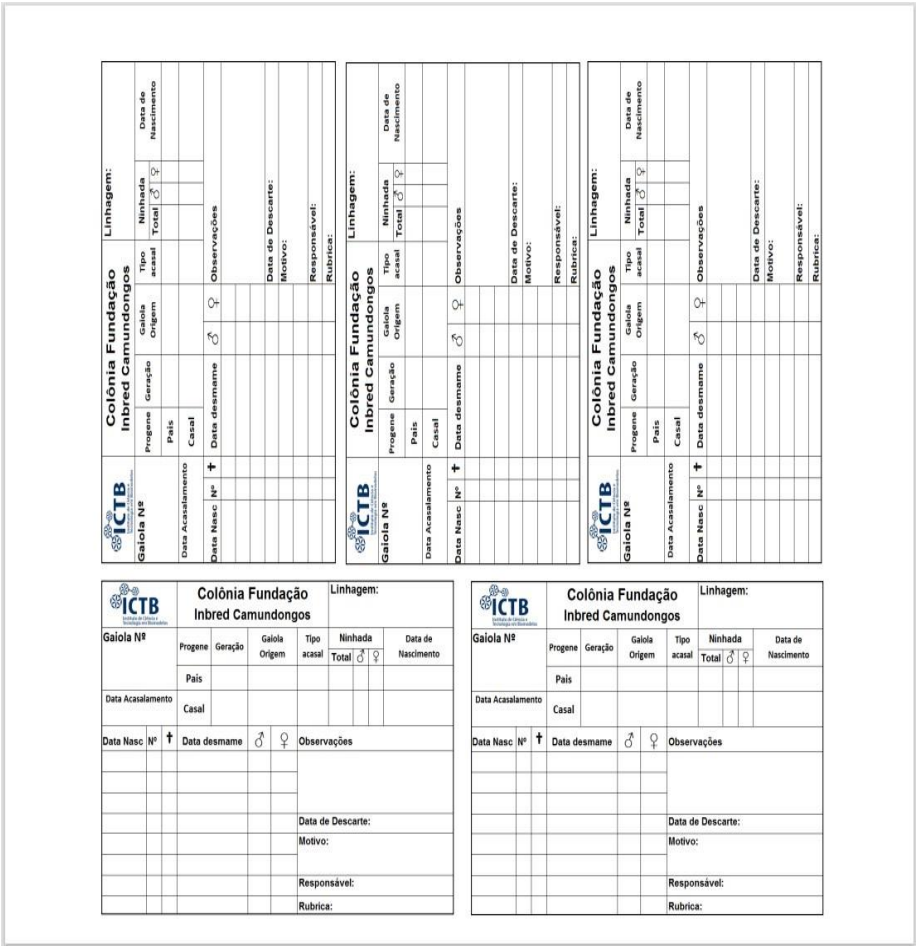


Figura 6- Exemplos de fichas de gaiolas: A- Fichas de colônias de fundação *inbred* B-Fichas de colônias de fundação para animais reservados para pesquisa ou renovação de outras colônias.

CAPÍTULO 5. Biologia e Manejo de Cobaias (*Cavia Porcellus*)

Apresentação

O porquinho-da-índia, cujo nome científico é *Cavia porcellus*, é também conhecido como cobaia. A cobaia doméstica é descendente do preá selvagem (*Cavia aperea*), um roedor sul-americano herbívoro.



Fonte: Cobaias Shorthair em gaiola de fibra de vidro com tubo de PVC, feno e papel autoclavado como enriquecimento ambiental – ICTB/Fiocruz

O termo cobaia é reconhecido, por muitos, como símbolo representativo do animal utilizado em pesquisas científicas. Nos séculos XIX e XX a cobaia foi de grande importância em diversos trabalhos científicos, como nos estudos de Robert Koch sobre a tuberculose (1882), tendo seu pico de uso em pesquisas na década de 1960 e desde então, o número de cobaias utilizadas por ano vem diminuindo.

Você sabia que todos os animais mantidos em instalações animais de pesquisa devem, obrigatoriamente, possuir ficha de identificação¿. Essas fichas devem estar visíveis em seus recintos, com informações sobre o tipo de pesquisa, agente infeccioso, protocolos que estão sendo utilizados, além da identificação e contato do coordenador da pesquisa

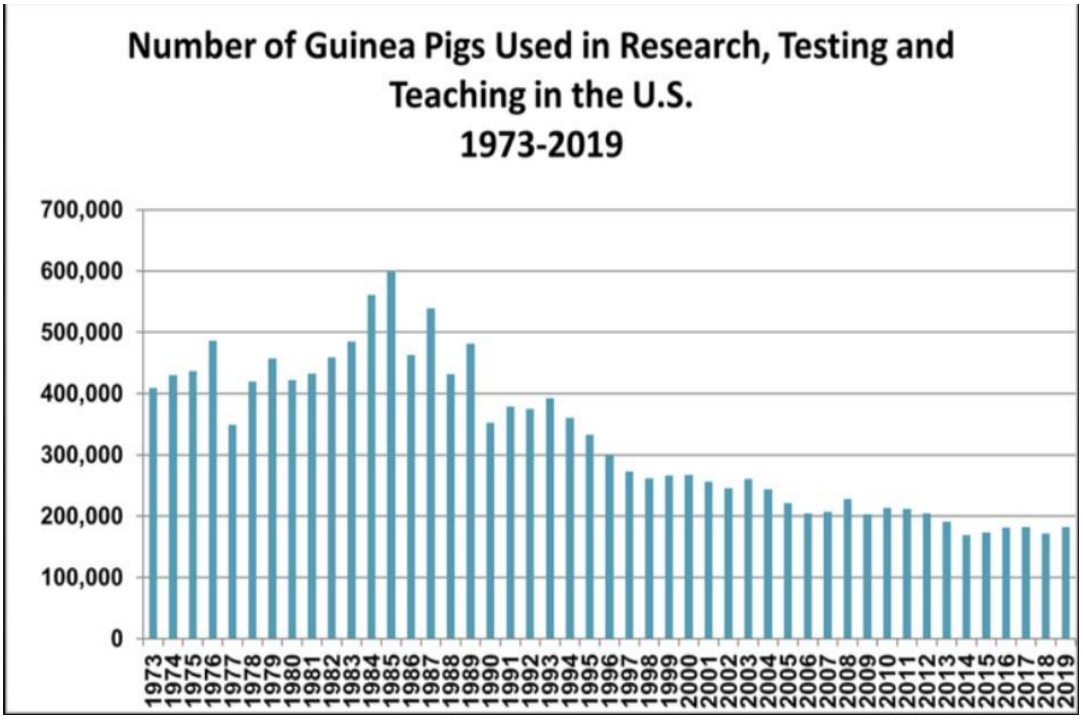
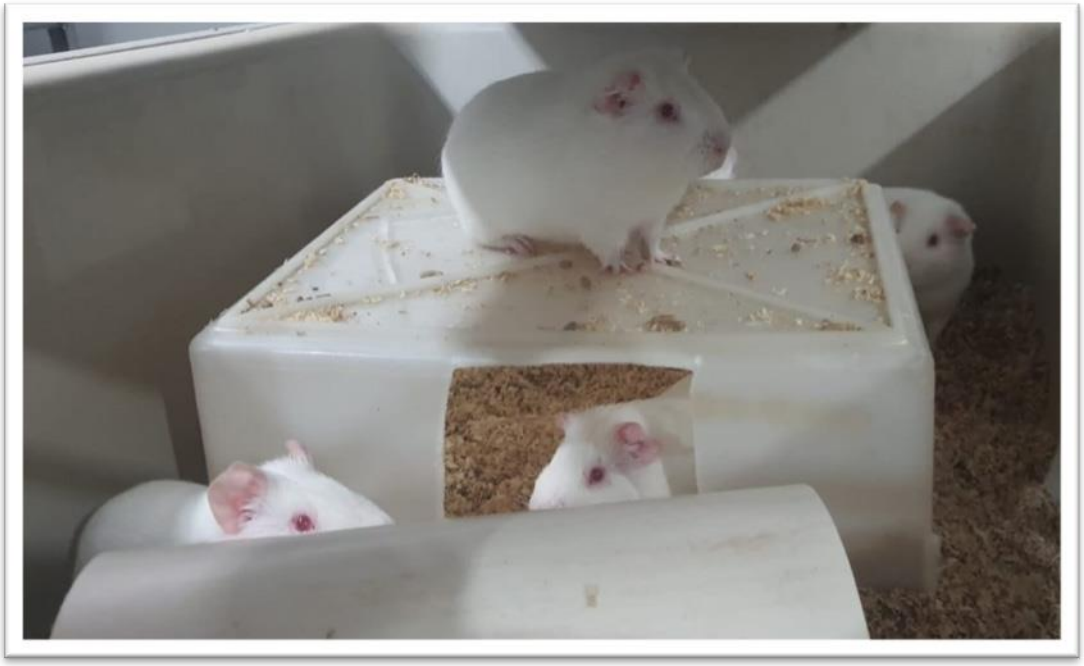


Fig x: Número de cobaias utilizadas em pesquisa e ensino nos Estados Unidos entre os anos de 1973 e 2019. Fonte: https://navs.org/learn-more/guinea-pigs-in-research/

Muito do declínio do uso deste modelo deve-se à utilização crescente de camundongos e ratos geneticamente modificados. Algumas das principais áreas da pesquisa que permanecem utilizando cobaias incluem estudos da anafilaxia, cetoacidose, neuropatias ópticas, escorbuto e o uso do sangue deste animal como fonte de alimentação para insetos hematófagos (que se alimentam de sangue), como barbeiros e mosquitos.

Na natureza os animais do gênero *Cavia* **são animais sociais que vivem em pequenos grupos de 5 a 10 indivíduos, em tocas ou fendas. São animais dóceis e de fácil** manipulação em laboratório e emitem sons característicos que parecem estar gritando “cuí, cuí, cuí”.

Existem várias linhagens (colônias consanguíneas) e *stocks* (colônias não consanguíneas) de cobaias, mas na experimentação animal, a linhagem mais comumente utilizada é a Shorthair, que possui pelagem curta, branca e características albinas. O macho adulto costuma pesar entre 500g e 600g e a fêmea adulta pesa entre 400g e 500g.



Fonte: Grupo de cobaias alojadas em gaiola de fibra de vidro com enriquecimento ambiental do tipo toca em PEAD. ICTB/Fiocruz

Reprodução

Em condições de laboratório as cobaias são poliéstricas não estacionais, ou seja, apresentam cios ao longo de todo o ano, embora alguma variação seja percebida no tocante ao desempenho reprodutivo.

Os machos atingem a maturidade sexual aos 3 meses de idade, com aproximadamente 500g e as fêmeas em torno de 300g, podendo isso, eventualmente, ocorrer antes de completarem o primeiro mês de vida (cio precoce).

A fim de evitar distocias (problemas relacionados ao parto), o primeiro parto deve ocorrer antes dos 6 meses de idade, anteriormente ao período de calcificação da pelve das fêmeas.

As cobaias fêmeas possuem uma membrana que se fecha sobre o orifício vaginal, exceto nos períodos de estro e parto, têm uma gestação relativamente longa, com períodos que podem ultrapassar 100 dias e um desenvolvimento muito precoce de seus filhotes ao nascer: já nascem de olhos abertos, comendo alimento sólido (ração e vegetais) e com pelos.

As fêmeas de cobaias possuem apenas dois mamilos e glândulas mamárias localizadas na região inguinal. Apesar de serem comuns ninhadas de 2 a 3 filhotes por gestação, ninhadas de 4 ou mais podem ocorrer e são comumente criadas sem dificuldade.



Fig : Fêmeas cobaias com filhote. ICTB/Fiocruz.

O acasalamento desta espécie em biotérios deve ser sempre realizado entre indivíduos que apresentem distância em parentesco, de forma a evitar consanguinidade. O acasalamento chamado de heterogênico ou não-consanguíneo pode ser feito no sistema de acasalamento poligâmico em harém ou acasalamento controlado, com a presença de 1 macho para 5 a 12 fêmeas em uma gaiola/recinto familiar.

Como vantagens do método harém temos um maior número de animais produzidos, utilizando menor espaço e as fêmeas auxiliando no cuidado e lactação dos filhotes, umas das outras. Como desvantagens temos a dificuldade de registro das crias por desconhecimento da mãe e de identificação de fêmeas inférteis.

Visando maior produtividade, os machos são mantidos com as fêmeas ao longo de todo o ciclo reprodutivo, com vistas ao aproveitamento do cio pós-parto. No caso de realização somente de acasalamentos programados, os machos podem ser retirados após verificação das fêmeas gestantes. O desmame ocorre aos 21 dias de vida, com filhotes pesando em torno de 180g.

Para separar fêmeas de machos ao desmame, a sexagem é feita com base na observação da aparência do sulco que existe no órgão genital, uma vez que fêmeas e machos possuem a mesma distância ano-genital (distância entre o ânus e a genitália) e o macho não possui o pênis exposto, sendo necessário pressionar o abdômen próximo à genitália para observá-lo. Desta forma, a observação do formato do sulco genital ajuda muito na identificação (fotos de sexagem de macho e fêmea de cobaias).

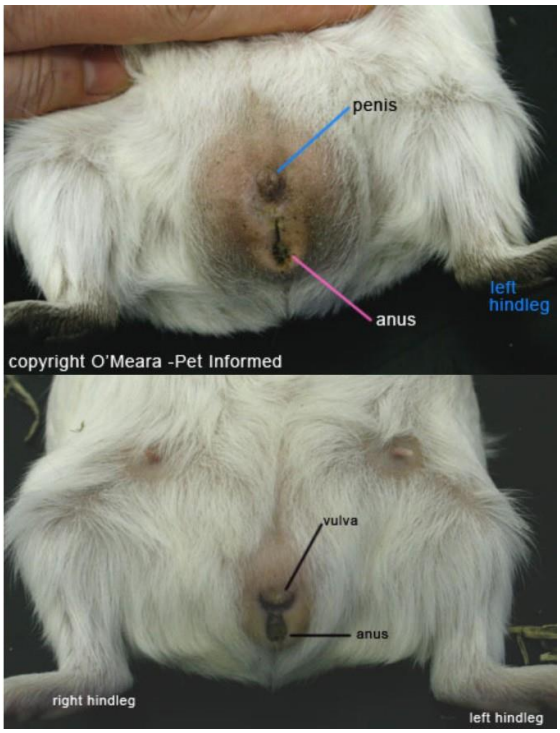


Fig x: Figura superior com genitais de macho cobaia e figura inferior com genitais de fêmea cobaia. Fonte: http://www.pet-informed-veterinary-advice-online.com/sexing-guinea-pigs.html

Alimentação



Cobaias em instalações animais de pesquisa alimentam-se basicamente de ração industrializada, a qual é elaborada para atender às necessidades nutricionais da espécie. As necessidades nutricionais das cobaias podem ser consultadas na publicação. Criação e manejo de cobaias. Couto, 2002. Em ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.

https://books.scielo.org/id/sfwtj/pdf/andrade-9788575413869-12.pdf

As cobaias não são capazes de sintetizar a Vitamina C e em razão disso devem receber suplementação adequada desta vitamina, evitando-se a hipovitaminose C e manifestação da doença escorbuto, assim como a predisposição a outras doenças.

Do ponto de vista alimentar, as cobaias são seletivas e não se adaptam facilmente a alterações na forma e sabor da comida e da água de bebida.

Adicionalmente, é recomendada a oferta de forragem com feno ou outras forragens que possam ser higienizadas e descontaminadas antes de serem oferecidas aos animais. Da mesma forma, a oferta de tubérculos como cenoura e outras raízes é uma alternativa de enriquecimento ambiental, desde que bem higienizados. É comum que os biotérios evitem o oferecimento de tubérculos e forragens que não podem ser autoclavados para resguardar o status sanitário das cobaias, isso dependerá do *status* sanitário da colônia, se convencional ou livre de patógenos específicos (SPF).

Manejo

Segundo as recomendações que constam na Resolução Normativa nº 15/2013, o espaço mínimo em um recinto para cobaias deve ser de 387cm^2 por animal.

No tocante às gaiolas, são utilizadas na criação de cobaias em laboratório tanto as plásticas ou fabricadas em fibra de vidro, com paredes sólidas, quanto as produzidas em telas de arame, com piso sólido produzido em plástico.



Fonte: Diferentes tipos de gaiolas utilizadas na criação e experimentação de cobaias em laboratório.

As gaiolas devem ser sempre forradas com material de cama (maravalha ou flocos de pinus ou Aspen ou outro material para forração atóxico. Este deve ser absorvente e deve ser trocado semanalmente. Para identificá-los uma alternativa é o uso de microchips. Uma outra possibilidade é a tatuagem individual, realizada no pavilhão interno das orelhas. Na experimentação, corantes atóxicos também podem ser temporariamente utilizados para identificação.

É muito importante para criação que os animais possuam identificação e fichas com dados zootécnicos, os quais devem ser constantemente atualizados, a saber: data de nascimento, grupo genético (para evitar acasalamentos consanguíneos), data de acasalamento, data dos partos, número de filhotes nascidos e desmamados etc.

Outro fato importante é que as cobaias são muito suscetíveis a doenças respiratórias, sendo importante a atenção à qualidade do ar no microambiente desses animais, no tocante à temperatura, umidade e principalmente limpeza da instalação, com especial cuidado com as gaiolas.

Quão próximos você imagina que cobaias e ratos de laboratório sejam?

A verdade é que biologicamente as cobaias são mais assemelhadas às chinchilas e aos porcos-espinhos do que aos camundongos e ratos.

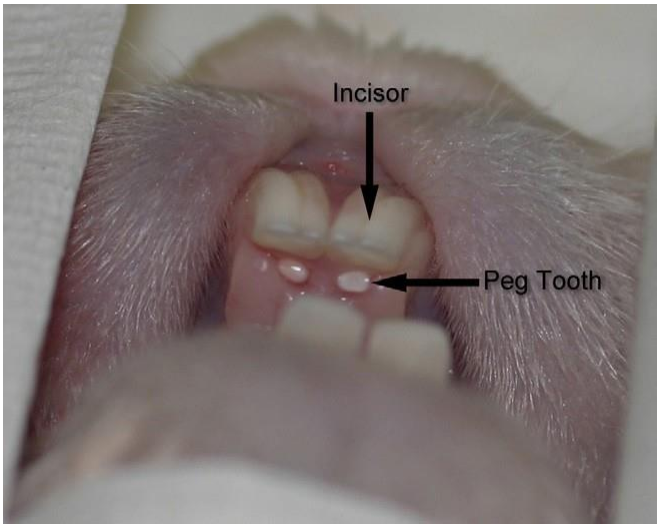
As cobaias realizam a coprofagia, que é o hábito de se alimentarem das próprias fezes. Esse hábito faz parte da fisiologia digestiva da espécie, pois, ao ingerirem suas fezes, há uma nova oportunidade de absorção e fixação de nutrientes como aminoácidos e vitaminas, produzidos principalmente pela microbiota intestinal.

Capítulo 6. Biologia e Manejo de Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

Você sabia que o coelho de laboratório é descendente do coelho selvagem europeu da península ibérica¿ A propagação do coelho em todo o mundo se deu principalmente como resultado das atividades do homem. A sua domesticação ocorreu a partir da criação dos coelhos silvestres (*Oryctolagus cuniculus*) dentro dos mosteiros franceses. Eles eram caçados e mantidos em grandes parques murados, onde passavam a viver. Não demorou muito para que começassem a se reproduzir nesses locais, cuja presença dos muros limitava a fuga e facilitava a caça. Esse processo também acabou resultando na criação de diferentes raças e variedades de coelhos hoje encontradas

Classificação científica

Os coelhos pertencem ao reino Animalia, filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, classe *Mammalia*, ordem *Lagomorpha* e família *Leporidae.* Durante muitos anos foram classificados como roedores, mas a presença de dois pares de incisivos superiores (figura 1) e um par de incisivos inferiores colocou os coelhos e lebres na ordem *Lagomorpha.*



Fonte: Cavidade oral de coelho demonstrando a presença de dois pares de incisivos superiores. Fonte: Sonho & Couto, 2012

A raça mais utilizada em pesquisas de laboratório é a New Zealand White (NZW), albina, que foi originalmente criada para a produção de carne, seguida das raças Califórnia e Holandês.



Fonte: Diferentes raças de coelho utilizados na pesquisa. A- Raça New Zealand White; B- Raça Califórnia e C- Raça Holandês. Fonte: Ferreira et al. 2012

Como modelo experimental, essa espécie tem sido utilizada em pesquisas alergênicas, nos testes de pirogênios, na produção de próteses ortopédicas, na pesquisa de biomateriais e na produção de anticorpos policlonais. É modelo de estudo de aterosclerose, utilizado em pesquisas quimioterápicas, entre outras.

Os coelhos ainda são utilizados na indústria cosmética em testes de irritabilidade, no entanto, esse uso tem diminuído drasticamente, devido à implementação de métodos alternativos.

Características comportamentais, anatômicas e fisiológicas

Quanto ao comportamento, os coelhos são animais sociáveis e dóceis que, em vida livre, passam grande parte do tempo em grupo estáveis e em contato próximo uns com os outros. A hierarquia dentro da colônia é bem definida e as brigas não são frequentes.

NA **NATUREZA**, apresentam hábitos crepusculares e noturnos, principalmente para escapar de predadores. Escavam tocas, que são túneis interconectados, que podem incluir um labirinto de corredores com rotas de fuga e ninhos, nos quais os filhotes são criados. Alimentam-se principalmente de raízes, caules, folhas e alguns grãos.

QUANDO AMEAÇADOS, os coelhos batem as patas traseiras como sinal de alerta para outros membros do grupo. Não costumam vocalizar dentro do espectro auditivo do homem, mas podem emitir um grito agudo quando capturados. Esses comportamentos também são observados em coelhos domésticos.

DENTRO DO BIOTÉRIO, os coelhos, quando lhes é ofertado um ambiente enriquecido, apresentam hábitos similares aos selvagens, como preparo do ninho, cópula, cuidados com os filhotes e marcação territorial. Entretanto, são ativos tanto no período diurno como noturno.

BIOLOGICAMENTE, os coelhos são animais macrosmáticos, ou seja, possuem alta sensibilidade olfativa e realizam marcação territorial com o uso de odores. Possuem três glândulas odoríferas localizadas na região anal, virilha e sob o queixo, que servem para marcação territorial e de indivíduos do próprio grupo. As fêmeas borrifam urina sobre os filhotes para marcar sua prole. Além do sentido olfatório, a audição também é muito desenvolvida e funciona para a defesa contra predadores. As orelhas são grandes, representam 12% do tamanho do corpo e são intensamente vascularizadas, funcionando como órgão termorregulador.

SEU ESQUELETO é leve e frágil e corresponde a apenas 7 a 8 % do peso corpóreo, como consequências, contenções feitas de forma inadequada podem resultar em fraturas, principalmente, nos membros posteriores e na coluna vertebral. Possuem os membros posteriores maiores que os anteriores, permitindo a locomoção através de saltos, que podem atingir a velocidade de 30 Km/h. O seu campo visual é de aproximadamente 190° em cada olho, porém a posição lateralizada do globo somente permite uma visão binocular; e os olhos possuem a membrana nictitante bem desenvolvida.

QUANTO AO SISTEMA DIGESTÓRIO, são animais herbívoros e monogástricos. Apresentam dentes com crescimento contínuo ao longo da vida e dois pares de incisivos superiores, que crescem aproximadamente 0,5 cm por ano e por esse motivo precisam de materiais para roer, promovendo o desgaste dentário.

QUANTO À ALIMENTAÇÃO, as porções alimentares indigestíveis são fermentadas no ceco, que é bem desenvolvido. Como a maior parte da absorção de nutrientes ocorre em porções anteriores ao ceco, o coelho realiza a cecotrofagia para absorção desses nutrientes, que consiste na ingestão dos cecotrofos diretamente do ânus. Os cecotrofos (figura 3) são conhecidos como “fezes noturnas”, sendo mais macias e de cor mais clara que as fezes. Eles são uma fonte importante de compostos contendo nitrogênio, como niacina, riboflavina, ácido pantotênico e cianocobalamina (vitamina B12). Possuem uma membrana mucoíde que os protege do pH baixo do estômago e são ingeridos inteiros. As fezes duras são produzidas durante as primeiras quatro horas de ingestão de alimentos, enquanto os cecotrofos são produzidos quatro a oito horas depois.



Material fecal normal de um coelho. Na direita cecotrofos, de aspecto amolecidos, conhecidos como “fezes noturnas”; na esquerda fezes diurnas, de aspecto mais duro. Fonte: Pritchett-Corning et al 2011.

A urina do coelho é geralmente turva, espessa e cremosa, devido à alta concentração de minerais como fosfato de amônio e magnésio e precipitados de carbonato de cálcio, apresentando pH alcalino (pH>8). Ao contrário do que ocorre com a maioria dos mamíferos, a urina é a principal via de excreção de cálcio e por isso os níveis de cálcio sérico variam de acordo com a dieta. Deve-se tomar cuidado com dietas prolongadas com excesso de cálcio, pois pode ocorrer calcificação da artéria aorta e do rim.

A temperatura média do corpo do coelho é de 38,5°C a 39,5°C, os batimentos cardíacos médio no animal adulto é 130 a 300 por minuto e a frequência respiratória varia de 32 a 60 respirações por minuto. Possuem um volume de sangue circulante de 44 a 70mL/Kg de peso vivo.

Reprodução

Os coelhos são animais de pequeno porte e extremamente prolíferos com ciclo reprodutivo rápido, gestação e lactação curta quando comparados a outras espécies. Ao contrário da maioria dos mamíferos, a coelha não tem ciclo estral regular, mas são poliéstricas e podem ovular a qualquer época do ano. Ela poderá ser fecundada durante 12 dos 16 dias de duração de seu ciclo ovariano.

O macho inicia a cópula cheirando, limpando, acariciando a fêmea. Faz uma elevação dos membros posteriores e urina sobre a fêmea, que demonstra receptividade exibindo a posição de lordose para permitir a copula. A cópula é rápida e geralmente acaba após alguns segundos, quando o macho cai de lado e emite um som característico após a ejaculação. Os machos quase que imediatamente voltam a copular novamente.

Você sabia que o coelho de laboratório é descendente do coelho selvagem europeu da península ibérica?

A propagação do coelho em todo o mundo se deu principalmente como resultado das atividades do homem. A sua domesticação ocorreu a partir da criação dos coelhos silvestres (*Oryctolagus cuniculus*) dentro dos mosteiros franceses. Eles eram caçados e mantidos em grandes parques murados, onde passavam a viver. Não demorou muito para que começassem a se reproduzir nesses locais, cuja presença dos muros limitava a fuga e facilitava a caça. Esse processo também acabou resultando na criação de diferentes raças e variedades de coelhos hoje encontradas

O parto acontece geralmente no período da manhã e tem duração média de trinta minutos a uma hora. Os filhotes do coelho são chamados de láparos e nascem sem pelos, com os olhos fechados e desprovidos de audição. Apresentam locomoção limitada que é estimulada pelo tato, além do olfato desenvolvido para reconhecer os odores do corpo da mãe. São extremamente sensíveis ao frio, pesam cerca de 50 g ao nascimento e ganham cerca de 30 g por dia. Abrem os olhos entre o 10° e 11° dia de vida e a audição se desenvolve ao mesmo tempo.

Na natureza, a fêmea amamenta os filhotes no máximo duas vezes ao dia e por isso é importante que a gaiola tenha um abrigo para que ela possa se isolar dos filhotes. Por volta do 20° dia de vida, os filhotes, que até então consumiam exclusivamente o leite materno, começam gradualmente a se alimentar também da ração e/ou alimentos sólidos. Entre o 21 a 25° dia, eles iniciam a cecotrofagia, que é responsável pela formação da microbiota intestinal do coelho.

De modo geral, o coelho Nova Zelândia de Laboratório apresenta em média 6 a 8 filhotes por ninhada e estão aptos ao desmame entre 40 e 50 dias de vida, quando estão pesando entre 0,8 e 1,5 kg.

Em biotérios com uma boa suplementação alimentar, as fêmeas podem ser acasaladas novamente de 4 a 8 semanas após o parto.

No momento do desmame é realizada a sexagem pela exposição do pênis do macho e abertura da vagina na fêmea e esses são colocados em gaiolas separadas. Este procedimento requer treinamento, uma vez que os testículos dos machos na idade do desmame ainda estão cavidade abdominal e o pênis é desprovido de glande.

Os animais devem ser identificados com etiquetas nas gaiolas e sempre que possível também devem receber marcação individual como por exemplo tatuagens de orelha e microchips implantados por via subcutânea. Como princípio geral, o método menos invasivo, compatível com o uso final, deve ser escolhido.

Os coelhos atingem sua maturidade sexual entre os cinco e seis meses de vida. Para seleção dos reprodutores, deve-se levar em consideração o padrão da raça, a genética e os melhores índices zootécnicos; além de características como peso, conformação corporal, vivacidade e saúde. Os machos são férteis mesmo cobrindo várias fêmeas num dia. É desejável, entretanto, pelo menos um período de descanso de 24 h. Segundo a Resolução Normativa Nº 33, que foi atualizada em 05 de outubro de 2022 pela normativa Nº 55 e revogada pela RN Nº 57 do CONCEA, devemos utilizar a proporção de um macho para cinco fêmeas,a fim de reduzir o risco de consanguinidade.

Em grande parte das criações de coelhos de laboratório no Brasil, o sistema de criação adotado é em gaiolas individuais. O processo de acasalamento se inicia pela escolha das matrizes fêmeas que estão sexualmente receptivas, que pode variar devido a diferenças individuais, estimulação sexual e fatores ambientais, como nutrição, luz e temperatura. Um bom indicador da receptividade da fêmea é a visualização da mucosa vaginal que apresenta aspecto intumescido, com secreção e coloração de rosa escuro a vermelho. A visualização do cio é importante para a fêmea aceitar a monta do macho, embora o animal possa emprenhar sem necessariamente apresentar cio visível. As fêmeas são levadas até a gaiola do macho e então o tratador deve observar a monta e garantir que a mesma ocorreu pela verificação da presença de líquido seminal na vulva.

Após o acasalamento, a fêmea é devolvida para sua gaiola e todo procedimento deve ser registrado em fichas e planilhas e os animais acompanhados. Em alguns casos, a fêmea não aceita o macho, ela pode ficar paralisada, tentar mordê-lo ou produzir uma vocalização especial. Caso a cópula não ocorra dentro 2 minutos, a coelha deve ser removida para evitar lesões e estresse de ambos os animais.

Em criações de animais de experimentação os reprodutores permanecem na colônia por aproximadamente 3 anos. No ICTB, todos os acasalamentos são programados e os dados referentes ao casal são anotados em planilhas de acompanhamento reprodutivo. Também adotamos o sistema de acasalamento estabelecido por Poiley, onde dividimos a colônia em 6 grupos genéticos, onde os animais são acasalados.

Esquema para acasalamento pelo método de Poiley para seis grupos.

GRUPO A FORMAR	MACHO DO GRUPO	FÊMEA DO GRUPO	
1	3	6	
2	6	1	
3	5	2	
4	1	3	
5	2	4	
6	4	5	

Fonte: Poiley, 1960

Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao Status Genético. Disponível em **https://books.scielo.org/id/sfwtj/pdf/andrade-9788575413869-11.pdf**

Alimentação



Os coelhos selvagens são noturnos e na natureza costumam pastorear durante seus períodos mais ativos do anoitecer ao amanhecer. No entanto, coelhos de laboratório em gaiolas são quase invariavelmente alimentados com rações peletizadas, que devem ser adquiridas de um fornecedor certificado para animais de laboratório. Apesar disso, sempre que possível e o experimento permitir, é benéfico complementar a ração com hortaliças (figura 5) e gramíneas devidamente higienizadas, uma vez que a dieta mista é uma característica do comportamento alimentar natural de herbívoros.

Coelhos recebendo enriquecimento ambiental com hortaliças no ICTB/Fiocruz. Fonte: Monica Souza Ferreira Pinto, Médica Veterinária, ICTB, 2021.

Todas as vezes que mudanças no fabricante ou na formulação da ração ocorrerem, a nova dieta deve ser introduzida lentamente ao longo de vários dias, aumentando-se gradualmente a nova dieta misturada à antiga, para evitar um impacto negativo sobre a microbiota intestinal.

A água deve estar sempre disponível, à vontade, a menos que seja restrito pelo protocolo de pesquisa. Coelhos alimentados com dietas secas requerem aproximadamente 120 ml água/kg de peso corporal ou aproximadamente 10% do peso corporal no intervalo de 24 h. A água pode ser ofertada por um sistema automático ou em garrafas que devem ser verificadas com frequência.

O tratamento da água varia de acordo com o status sanitário da criação, além de filtrada, recomenda-se que a água seja autoclavada ou acidificada. Quanto às características físico-químicas, deve ter os mesmos padrões de potabilidade utilizados para o consumo humano. Independentemente do tipo de tratamento, a sua qualidade deve ser avaliada periodicamente para garantir a ausência de impurezas e agentes infecciosos.

Manejo

No momento de projetar o alojamento e elaborar o manejo dos animais de laboratório deve-se levar em consideração comportamentos naturais e preferências das espécies. A integridade da pesquisa conduzida com os animais depende que estes permaneçam livres de doenças e angústias durante o período experimental. Neste sentido, as condições de alojamento e procedimentos de manejo devem ter *layout* e qualidade de forma a proteger os animais da exposição inadvertida a doenças e estresse ambiental.

- **As gaiolas**

Todas as gaiolas dentro de uma instalação de pesquisa animal devem atender aos mesmos critérios mínimos de contenção, deve ser segura, sem bordas afiadas ou saliências que possam causar lesões.

Coelhos de laboratório são tradicionalmente alojados individualmente em gaiolas por até vários anos, dependendo do propósito da pesquisa. De forma geral, para biotérios existem três tipos principais de gaiolas: produzidas em arame; folha de metal com arame; e fundo plástico com frente de arame.

Nos modelos disponíveis no mercado o piso das gaiolas possui diversos furos ou gretas que permitem que as fezes e a urina caiam em uma bandeja com material absorvente, com a finalidade de redução dos odores na sala.

As gaiolas são geralmente dispostas verticalmente, de 3 em 3, num sistema de racks com rodízios e abaixo de cada uma é utilizada uma bandeja coletora com material para absorver a urina e diminuir os odores da sala.



Racks constituídos por três gaiolas com fundo e bandeja coletora plásticos e paredes de aramado em aço inox no ICTB/Fiocruz.
Fonte: Monica Souza Ferreira Pinto Pinto, Médica Veterinária,ICTB, 2021

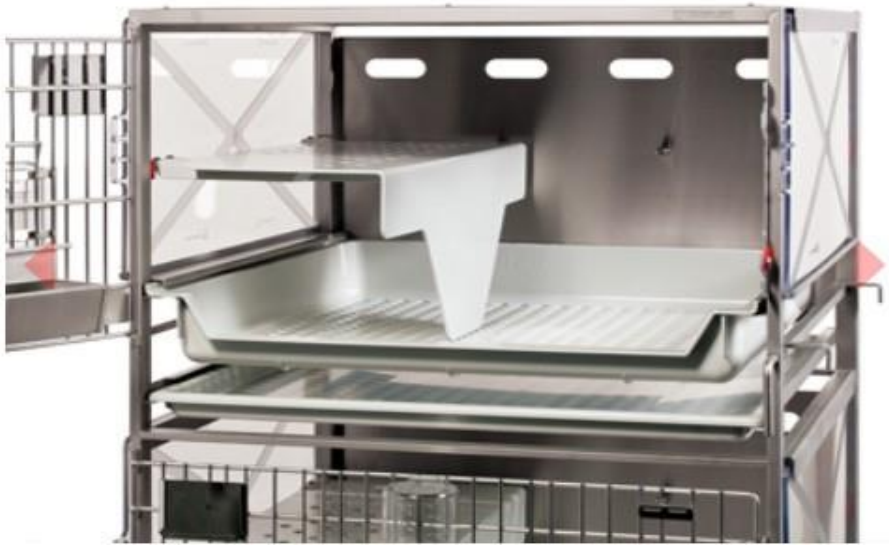
Ao escolher a gaiola para coelhos, é importante que as distâncias vertical e horizontal sejam levadas em consideração, a fim de garantir que esses animais possam assumir a postura típica de vigia, ou seja, possam ficar sobre as duas patas traseiras. Elas também devem ter espaços que permitam aos coelhos saltar e manter contato visual com outros indivíduos da mesma espécie e por isso, recomenda-se que as janelas gradeadas ocupem 30- 50% da área total da parede.

As dimensões para gaiolas de coelhos no Brasil foram estabelecidas na Resolução Normativa CONCEA nº 15, de 16.12.2013.

Quadro: Recomendações de espaço mínimo para coelhos alojados em pares ou em grupos

Peso (kg)	Área/Animal (m²)	Altura (cm)	Observações
< 2	0,14	40,5	Animais maiores podem necessitar de maior espaço para o adequado desenvolvimento
2 a 4	0,28	40,5	
4 a 5,4	0,37	40,5	
≥ 5,4	≥ 0,46	40,5	

Fonte: Resolução Normativa CONCEA nº 15, de 16.12.2013



No Brasil ainda é muito comum a utilização de gaiolas com fundo de arame, estas devem ter uma área de piso sólido, que pode ser feito utilizando uma placa de polipropileno removível, a fim de evitar lesão nas patas dos coelhos. Embora não seja um item obrigatório, recomenda-se a utilização de rampas para salto dentro da gaiola. Existem modelos disponíveis no mercado que já vem incorporados às gaiolas.

Gaiola com rampa integrada e bandeja coletora de dejetos. Fonte: https://www.tecniplast.it/en/product/r-suite-rabbit-housing-rack.html

A maioria das criações de coelhos de laboratório do país, a cama é utilizada de forma indireta, nas bandejas coletoras, abaixo das gaiolas. Neste caso, o fator mais importante para sua escolha é a absorção, uma vez que o animal não entra em contato com o material. Podem ser usados produtos como maravalha, serragem, papel, tapetes absorventes, entre outros.

As caixas-ninho também devem ser construídas com materiais que são facilmente higienizados e duráveis, por exemplo aço inoxidável ou plástico durável. Orifícios de drenagem para a urina não são essenciais porque a coelha passa pouco tempo no ninho. Deve conter uma cama no seu interior, que pode ser constituída de algodão, maravalha ou feno.

A maioria das gaiolas comerciais para o uso de coelhos em pesquisa utilizam o comedouro do tipo "J", que permite a reposição de ração sem necessidade de abertura da gaiola dos animais.



Fonte: https://celeirodobrasil.com.br/wp-content/uploads/2018/10/Gaiolas-de-arame-para-a-cria%C3%A7%C3%A3o-de-coelhos.png

A água pode ser fornecida através de garrafas de água ou sistemas automáticos. A seleção do sistema apropriado depende do número de animais, do tipo de pesquisa e de gaiola.

Garrafas de água são comumente usadas, principalmente quando um pequeno número de coelhos está sendo alojado ao mesmo tempo.

Os materiais utilizados na confecção das garrafas são poliestireno, polisulfona ou vidro, com tampas de borracha e/ou aço inoxidável.

Quanto às características ambientais

Os coelhos são extremamente sensíveis às mudanças bruscas, com efeitos do ambiente refletindo nos índices de produtividade. A temperatura crítica baixa é - 7 °C e a alta é 28 °C, a umidade relativa não deve ser menor que 45% e a exaustão deve permitir 15 a 20 trocas de ar total por hora. A sala deve ter ciclo de 12-12 h de claro/escuro, com intensidade de luz de 200 lux um metro acima do chão. Níveis muito altos de iluminação podem gerar degeneração da retina.

A frequência de troca de gaiolas, limpeza e desinfecção da sala, depende do número de animais e da eficiência do sistema de ventilação. No ICTB realizamos a troca de todas as gaiolas e a higienização das salas semanalmente. Os racks contendo três gaiolas são trocados por inteiro, animais são retirados das gaiolas sujas e colocados em gaiolas limpas. Todo material é lavado com jato sobre pressão e higienizado com desinfetantes apropriados para uso em criações de animais.

Os coelhos raramente são agressivos se manuseados com calma e firmeza

Para uma contenção segura pega-se o animal com uma das mãos na pele do pescoço e com a outra apoia-se as patas traseiras, segurando-o junto ao corpo. Para trajetos maiores, coloca-se o coelho no antebraço com a cabeça dirigida para o corpo do manipulador e segura-se firmemente as patas traseiras. Nunca se deve levantar o coelho pelas orelhas e patas, pois são propensos a lesões e fraturas na coluna vertebral e ossos.

Quanto à identificação

Quanto à identificação desses animais nos centros de criação e pesquisa de animais de laboratório, é importante manter o registro da pesquisa em fichas e cartões presos às gaiolas. Quando os animais estão em pares ou agrupados podem ser utilizados métodos como tatuagens de orelha, brincos de orelha, tinturas de pele e microchips subcutâneo.

Apesar de muitos países adotarem o sistema de criação para coelhos em gaiolas individuais, alguns países como Suíça, Reino Unido e Canadá mudaram consideravelmente a sua abordagem sobre a habitação de coelhos. Nesses países é obrigatório o alojamento em grupos na criação, uma vez que isso possibilita a melhor expressão do comportamento social e melhora a locomoção dos animais. O guia "*Refining rabbit care: A resource for those working with rabbits in research"* da RSPCA/UFAW ensina o passo a passo para a introdução desse tipo de alojamento nos centros de criação de animais de laboratório.

UNIDADE 3 – BEM-ESTAR ANIMAL E A CAL

Capítulo 1 - Biologia, etologia e bem-estar animal.

A manutenção do bem-estar animal é uma prática que requer o conhecimento de sua biologia, seu comportamento natural e seu comportamento em restrição de espaço nos biotérios. A melhor forma de oferecer bem-estar ao animal é proporcionar condições com que esse indivíduo tenha a possibilidade de escolha de materiais, insumos e equipamentos que mais lhe proporcionem conforto. Dessa forma, naturalmente, sua qualidade de vida estará elevada e o bem-estar assegurado.

Por fim, um importante ponto é a capacidade e a sensibilidade da observação do comprometimento do bem-estar animal ou da presença de desconforto, sofrimento ou dor. Precisamos refinar os nossos conhecimentos e técnicas para que esta observação possa ser realizada o mais breve possível, evitando assim a relação desnecessária entre duração & intensidade do sofrimento do animal em laboratório.

Como você viu anteriormente, a ciência de animais em laboratório possui uma grande diversidade de espécies utilizadas. As espécies *Mus Musculus* (camundongo) e *Ratus Rattus* (Rato) são as espécies com maior número de publicações em manuscritos indexados, aproximadamente um milhão de artigos científicos. Contudo, quantitativamente, o camundongo, por diversos motivos, ainda continua sendo a espécie mais utilizada nesses manuscritos.

Nossa experiência com camundongos é vasta. Além disso, são informações menos acessíveis do que para outras espécies, como a de Primatas Não Humanos. Dessa forma utilizaremos o modelo animal camundongo como um exemplo de conhecimento de todos os requisitos necessários no entendimento de como a genealogia e o comportamento natural podem ser importantes para o bem-estar dos animais mantidos em biotério atualmente.

Os camundongos são classificados como membros da Ordem Rodentia e Familia Muridae. Apesar de ser um animal muito conhecido a sua origem ainda não foi totalmente elucidada. Alguns estudos realizados em fósseis de dentes molares encontrados na Ásia, numa região desértica entre a Índia e o Paquistão, foram usadas para reconstruir a filogenia datada da família Muridae. Deste modo, utilizando um conjunto de dados morfológicos e genéticos foi possível verificar que a família Murídae provavelmente se originou no curso do Mioceno Inferior, ou seja, 22 a 17 milhões de anos atrás (Ma), e a maioria das principais espécies e subespécies como o camundongo, começaram a se diversificar e evoluir entre 10 a 14 Ma.

O mais antigo murídeo fóssil conhecido, *Antemus chinjiensis*, foi registrado na região chamada de Indo-Paquistão no médio Mioceno, há 14 Ma, seguido de *Progonomys hussaini* no Mioceno superior, que teve uma distribuição maior incluindo várias regiões da Ásia, Europa e África.

O *Mus autor*, que representa o primeiro chamado *Mus*, também apareceu na região do subcontinente da Índia e é datado também no Mioceno com cerca de 5,5 Ma.

De acordo com sua morfologia dentária, *M. autor* poderia ter sido o ancestral de todo o gênero, e não apenas do subgênero *Mus*.

Contudo devemos ressaltar que antes do *Mus autor* ainda houve um descendente chamado de *Progonomys debruijini* e entre os dois gêneros *Progonomys* sugere haver um ancestral ainda não identificado que dividiu, ao final, o gênero *Mus* e o *Karnimata* e *Parapelomys*.

O camundongo é um filhote de rato?

Você deve saber que não, porém um grande número de pessoas acha que sim. Acreditam que o camundongo é um rato pequeno, são da mesma espécie e até andam juntos... A resposta está no dente. Sim... Até agora o que se sabe sobre a genealogia dessas espécies advém de fósseis dentários.

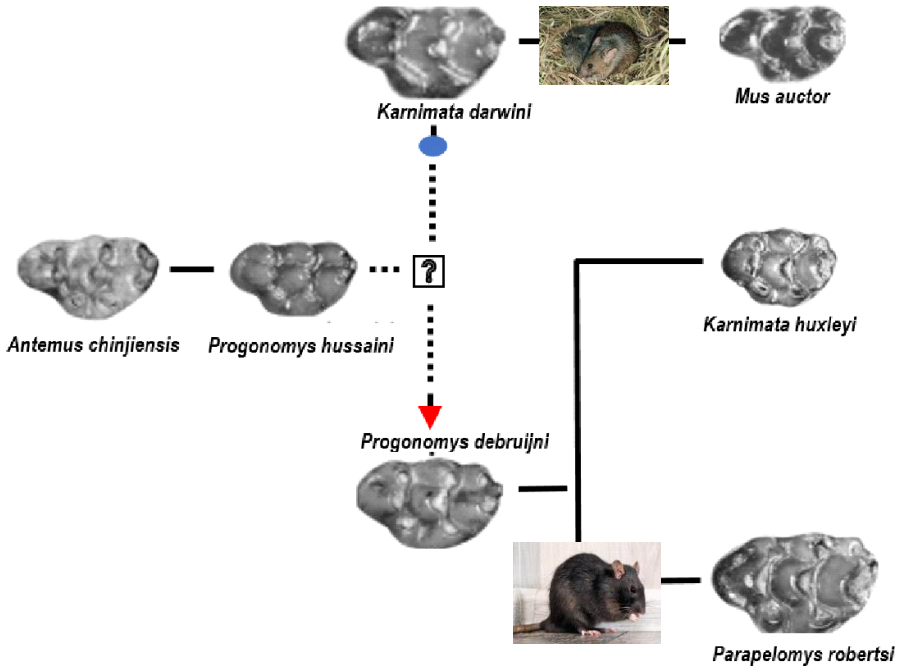


Figura : Origem e diferença entre camundongo e rato. Oliveira, GM. Origem, comportamento e bem-estar de camundongos. 2021.

O ponto de interrogação na figura é a chave para demonstrar que ambas as espécies são muito distantes filogeneticamente. Os cientistas acreditam que houve uma espécie (ainda não conhecida) que por alguma pressão evolutiva gerou outras duas espécies a que originou os ratos e a *Mus auctor* que originou as diversas subespécies de camundongos encontradas nos dias de hoje após milhões de anos.

O que mais confunde é a morfologia. Há sempre a sensação que o camundongo irá crescer até o tamanho de um rato. No entanto as diferenças são em número maior que as semelhanças.

Você saberia dizer qual a posição dessas duas espécies na cadeia alimentar? Porque após a divisão, não houve nenhuma mudança morfológica significativa entre as duas espécies, apesar de milhares de anos? O comportamento das duas espécies é similar?

O comportamento do camundongo é extremamente interessante e complexo, mesmo quando mantidos em biotério. É importante destacar, que desde sua origem, sempre esteve ligado aos seres humanos, acompanhando a imigração humana pelo planeta. Os camundongos se distribuíram geograficamente desde as regiões árticas até as regiões desérticas de sua origem. A pressão seletiva de clima, relevo, oferta de alimento e acasalamento promoveu uma diferenciação em várias subespécies, sendo as mais conhecidas a Mus musculus musculus e a Mus musculus domesticus (camundongo peridomiciliar). Apesar de poucos estudos, as informações são que na natureza se organizam em sistema de harém, com um macho dominante, várias fêmeas e alguns subordinados. Esses grupos, podem trocar os subordinados (entre a mesma subespécie) para manter a variabilidade genética. São altamente territorialistas, vorazes e com altas taxas reprodutivas..

Os pontos de intersecção entre os camundongos em ambiente natural e os camundongos em biotério.

- ### Comportamento individual

Sobreviver, por isso busca de abrigo e proteção. Territorialismo, pois o dominante possui maior chance de acasalamento e transmitir o seu material genético. Oferta de alimento, o camundongo, inclusive estabeleceu a relação com o ser humano, baseado na facilidade de acesso ao alimento. Alta capacidade de adaptação a novos ambientes, desde que os quesitos anteriores estejam sendo providos.

- ### Comportamento Social

Altamente sociais. Comunicam-se continuamente, sendo pelo maio de ruídos ultrassônicos, sejam por meio de odores ou, muito importante, o estímulo tátil, ou seja, o contato físico. Possuem um limiar de estresse reduzido (quando comparado ao ser humano), mudanças bruscas em sua rotina, com incapacidade de adaptação lenta, promove diversas alterações comportamentais, dentre elas a agressividade. A agressividade na natureza é minimizada pela possibilidade de fuga. Em biotério, torna-se um fator comprometedor do bem-estar. Principalmente em machos adultos. Porém, camundongos recém-desmamados, quando agrupados de diferentes casais, formam uma relação fraternal, e interessantemente, não demonstram agressividade durante seu convívio durante a idade adulta.

Os camundongos mantidos em restrição em biotério não estão em sofrimento.

Todas as linhagens de camundongos utilizadas atualmente, inclusive as mais complexas transgênicas, são originárias de camundongos selvagens que alguns criadores capturaram e criaram. Um exemplo clássico da facilidade de adaptabilidade e domesticação do camundongo foi o de Abbie Lathrop, uma professora aposentada e seu esposo Leo Loeb. Esse casal capturou camundongos selvagens da região de Vermont e Michigan (EUA) e os mantiveram com sucesso em cativeiro em sua fazenda em Granby, Massachusetts.

Esses camundongos capturados, cresceram, se reproduziram e foram vendidos aos pesquisadores que desenvolveram diversas linhagens, sendo a primeira a DBA, para estudos oncológicos pelo Dr. Clarence Cook Litte da Universidade de Havard.

Até os dias de hoje, com toda a manipulação genética e por tantos anos, alguns autores acreditam que os camundongos em biotério já sejam uma outra subespécie a *Mus musculus laboratorius*.

Por fim, ainda precisamos estudar muito e gerar conhecimento sobre várias questões da ciência de animais de laboratório, entendendo como esses animais se relacionam com os insumos e rotinas que impomos a eles. Apesar de haver discussões e teorias sobre o bem-estar dos camundongos criados em biotério, é sabido também que o biotério oferece a esse animal proteção e condição de adaptação pela estabilidade das condições ambientais. Além de farta e fácil oferta de alimento de alta qualidade.

Nos biotérios de criação, além disso tudo, ainda é possível o acasalamento em caráter de harém sem busca ou disputa. Esses quesitos sugerem que os animais mantidos em conformidade aos princípios éticos e a legislação nacional estão com seu bem-estar preservado em biotério.

Em sua biologia metabolicamente acelerada, sua relativa susceptibilidade ao estresse, seu comportamento individual intrinsicamente ligado ao social, a palavra adaptação é a imperativa para o bem-estar é adaptação. Dessa forma devemos caminhar sempre no sentido do Refinamento, parte dos 3Rs, para possibilitar esse animal a escolher: estantes, caixas, camas, número de higienizações, ração, enriquecimento ambiental que mais promova conforto ao próprio. Dessa maneira, devemos manter a rotina ou mudá-la de forma mais sutil possível e buscar técnicas e equipamentos que possibilitem a avaliação da escolha do animal.

CAPÍTULO 2 - Manipulação das principais espécies, procedimentos para administração de substância e inóculos e a coleta de sangue:

A ciência de animais de laboratório abrange diversas e diferentes espécies. Cada espécie, possui peculiaridades para a realização dos procedimentos básicos para sua manipulação, vias de administração e inóculos e a coleta de sangue.

A realização de procedimentos básicos com animais em laboratório obedece a avaliação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) de cada instituição, que por sua vez é orientada pela Resolução Normativa Nº 55 de 05 de outubro de 2022 pela normativa Nº 57 de 06 de dezembro de 2022 , elaboradas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), nas quais são descritos os principais procedimentos para Roedores e Lagomorfos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica do "Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividade de Ensino ou Pesquisa Científica", disponível na biblioteca do curso.

Além disso, Resoluções Normativas recentes do CONCEA buscam harmonizar e aplicar em todas as instituições brasileiras cursos de capacitação na realização dos respectivos procedimentos. Então vale ressaltar, que qualquer procedimento, mesmo básico, somente pode ser realizado se estivem em acordo com a legislação vigente e devidamente autorizado pela CEUA de cada instituição.

De forma geral, os procedimentos utilizando animais com fins didáticos ou científicos devem ser realizados com responsabilidade e respeito ao animal. Além disso, deve ser exaustivamente treinado, em manequins, cadáveres ou outros modelos, sob supervisão de um Médico Veterinário Responsável para que somente após essa etapa, tanto o aluno, o técnico ou mesmo o professor ou o pesquisador possa realizar o procedimento no animal de forma segura e comprometendo o mínimo possível o bem-estar do animal.

Em todas as espécies, dependendo do procedimento irá haver um processo de estresse. Contudo a resiliência ou o estado de estresse crônico poderá se instalar dependendo de inúmeros fatores, como a severidade do procedimento, a inabilidade de realização e a falta de adaptação do animal ao procedimento e principalmente a relação entre a intensidade e a frequência do procedimento.

Por esses motivos sugerimos fortemente, que após seguir todos os trâmites legais anteriormente descritos a realização dos procedimentos seja realizado de forma mais uniformizada possível. Principalmente pelo mesmo manipulador.

Nessa questão, apesar da legislação, deve haver uma flexibilização onde a supervisão do Médico Veterinário é irrevogável. Contudo, alguns profissionais de outras profissões possuem uma habilidade superior ao Médico Veterinário, nesse caso, sugerimos que a Supervisão do Médico Veterinário seja uma condição, contudo o procedimento seja realizado pelo profissional mais hábil. Pois eticamente o objetivo legal é o bem-estar animal e esse pode ser atingido dessa forma, trona-se aceitável.

Os principais sinais clínicos e comportamentais aos quais os procedimentos estão sendo realizados de forma desconfortável ou promovendo estresse crônico são: em machos a presença de agressividade exacerbada, comportamentos alterados, como atitudes repetitivas e compulsivas, como se pendurar na grade diversas vezes num curto espaço de tempo, diminuição de alimentação e consequentemente perda de peso. Além disso, aumenta a irritabilidade do animal ao procedimento, o que pode causar acidentes, principalmente fugas, ataques ou mordidas.

Dentro das espécies mais utilizadas, camundongos, ratos, coelhos, cobaias e hamster iremos descrever os procedimentos básicos utilizados na rotina deum biotério ou instituição de ensinou pesquisa científica.

Contenção física:

A contenção física é o procedimento mais básico dentro de um biotério. Ele pode ser realizado no recebimento dos animais, na higienização das gaiolas e principalmente durante a realização de ensaios.

Exceto o hamster, que possui um comportamento naturalmente agressivo e de baixa sociabilidade, as demais espécies apreciam a relação com o manipulador. Desde que, como já dito, haja um período de adaptação, a criação de uma rotina e o procedimento mantenha a relação entre a capacidade do indivíduo em assimilar a situação de estresse, que por sua vez está ligada, no caso da contenção física, a habilidade do manipulador, a repetibilidade do procedimento e a duração da imobilização.

A contenção física em todas as espécies deve ser num tempo menor possível. Há várias formas de ser realizada a contenção física. Nesse caso também deve ser avaliado fatores como:

- capacidade de realização, com segurança, pelo manipulador.
- alto nível de treinamento prévio ou tempo de experiência na realização da contensão física.
- Ser organizado e minucioso, tendo toda seu procedimento planejado e esquematizado.

Sugere-se, mesmo que não necessária, a contenção física para inóculos de agentes patogênicos. Essa contenção, sendo bem realizada, capacita e habitua ao manipulador a realizar qualquer outro procedimento com segurança para si próprio, minimiza o risco de fuga e mordidas e possibilita a realização de diversos outros procedimentos, como a administração oral (gavagem), inspeção clínica e outros.

Em camundongos essa contenção baseia-se na colocação do animal na própria tampa da gaiola. O animal, por instinto, se for puxado levemente pela cauda, tende a se segurar no “aramado”, dessa forma, a região de imobilização, a cernelha, ou a pele acima da região da coluna torácica possa ser, com dedo “em pinça” habilmente puxada de forma com que a cabeça do animal não possua a capacidade de morder e nem realizar a compressão torácica excessiva, impedindo o animal de respirar. A partir dessa imobilização, com os dedos, imobilize a cauda, pois o camundongo perderá sua capacidade de se locomover em sua mão e imobilize, com suavidade, uma das patas.

Dessa forma o manipulador está seguro para realizar três outros procedimentos básicos num biotério:

• a via de administração intraperitoneal
• a via subcutânea
• a gavagem
• realizar com segurança a inspeção física de todas as partes do corpo do animal.

Em outras espécies a imobilização necessita ser realizada através do “embalamento” com um tecido próprio para imobilização como os coelhos. Os ratos também possuem um tipo de imobilização diferente, as vezes dependendo de duas pessoas, assim como o hamster e os cobaios.



Figura 1: *Utilização do Tubo ou Cano:* Atualmente á uma corrente que acredita e alguns trabalhos demonstram que a utilização de Tubos de Papelão ou Canos de PVC para realizar o transporte, principalmente de camundongos e ratos de uma caixa para outra no momento da higienização das gaiolas eleva o conforto do animal. Figura : Utilização do Tubo ou Cano. Gabriel Melo de Oliveira, 2021

A nossa opinião, pelos anos lidando, observando e cuidando de camundongos de diversas linhagens (algumas delas mais tranquilas, como a Balb/c, outras mais agitadas como a C57Bl/6) é que no geral, quando realizado corretamente os animais gostam do contato físico com o ser humano. Não estamos descartando o uso de objetos, contudo não acreditamos que esse fato comprometa a qualidade de vida do animal. (Gabriel Melo de Oliveira, 2021)

Acreditamos que os animais, inclusive demonstram maior interesse ou prazer com o uso dos tubos, pois se torna um enriquecimento ambiental, ou um momento em que é ofertado um objeto que os roedores adoram, entrar em tocas.

Agora, tão quanto segurar o animal pela cauda, em pinça pela pele da cernelha ou outra forma como o uso de tubos e diversos objetos, deve ser realizado de forma suave e tranquila, respeitando o animal e sem tratar o animal como o objeto.

Nós preferimos o dedo em pinça na pele da cernelha. Acreditamos que os animais gostam do contato físico periódico e rápido com o ser humano. Complementamos também que para o manipulador, é importante estimular o sistema tátil e sensorial.

A textura da pele e do pelo (mesmo com luva), o calor da pele do animal, segurar o corpo do animal faz bem ao manipulador, isso é chamado de Biofilia, ou seja, o contato direto com o animal, estimulando e estimulando sensorialmente é um hábito primitivo do ser humano que estimula os centros nervosos de prazer no sistema nervoso central. **E você, o que pensa sobre isso?**

Contenção farmacológica:

A contenção farmacológica deve ser realizada através do uso de tranquilizantes/sedativos, na dosagem correta, para que o animal tenha um maior tempo de imobilização minimizando o desconforto. O ponto redundante é que para se realizar a contenção farmacológica é necessário realizar a contenção física para a administração do fármaco, seja por via intraperitoneal, subcutânea ou mesmo venosa, mais comum em coelhos. Então de qualquer forma, voltamos ao ponto de um excelente treinamento em contenção física seja primordial.

Uma questão importante é a utilização da contenção farmacológica. Existem procedimentos que são altamente arriscados em nível biológico para o manipulador. Nessa situação, recomenda-se a utilização da contenção farmacológica, bem como em situações de transportes em pequenos percursos.

O sedativo ou tranquilizante não inibe a dor, somente relaxa o animal. O mesmo acontece com subdoses de anestésicos injetáveis. Então é proibitivo a realização de procedimentos que possam causar dor em animais em contenção farmacológica. O animal irá sentir toda a dor e não conseguirá reagir.

Um ponto importante a ser relevado na escolha do fármaco para a realização da contenção farmacológica é o tempo em que o animal leva para se recuperar da tranquilização. Quanto mais profunda for a sedação e mais rápida a volta para o estado normal melhor. Por fim, nunca deixar água acessível ao animal sob sedação, pois o risco de afogamento é grande.

VIAS DE ADMINISTRAÇÃO.

Em relação as vias de administração de substâncias ou inóculos alguns tópicos necessitam ser analisados antes da escolha:

- Espécie utilizada no modelo experimental:
- Acessibilidade e facilidade de administração;
- Volume da substância administrada e a sua repetição;
- Velocidade de ação necessária para substância e o tempo de ação;

O ponto mais importante: a habilidade e segurança do manipulador em realizar o procedimento de administração, principalmente quando se tratar de inóculos de agentes patogênicos.

Principais vias de administração de substâncias para animais em laboratório:

a) Via Oral:

A utilização da via oral pode ser realizada de duas formas: pela diluição da substância na mamadeira e por gavagem . Na diluição de substância diluída na mamadeira possui a vantagem de evitar o desconforto dos animais pela contenção física. Contudo, apresenta a desvantagem de a ingesta da substância por cada indivíduo não possuir a exatidão que a gavagem oferece. A realização desse procedimento parte primeiramente de cálculos baseados nos seguintes quesitos:

- Cálculo em miligramas por quilograma de peso de cada animal que o animal necessita ingerir em 24h
- Multiplicar pelo número que compõem o grupo;
- Cálculo do volume ingerido de água com a substância em 24h;
- Cálculo da diluição dessa substância no volume de água da mamadeira de forma que o animal ingira a concentração necessária da substância;

Uma questão que deve ser relevada nessa situação é a palatabilidade da substância diluída na água ingerida pelos animais. Se for de pouca palatabilidade os animais diminuirão sua ingesta de água, ao inverso, se a palatabilidade for alta, aumentarão a ingestão de água. Além disso, sugerimos observar o tempo de estabilidade (eficácia) da substância após sua diluição na água da mamadeira.



Imagem internet - https://c2.staticflickr.com/4/3044/2917664577_735836dda4_b.jpg

A gavagem é a administração por via oral de uma substância, após a contenção física utilizando a chamada “agulha de gavagem” onde se insere na boca do animal e após a passagem pela região orofaríngea se administra a substância. Sua vantagem é que o animal receberá a dose em mg/Kg exata da substância necessária no protocolo. As desvantagens são que somente pessoas altamente treinadas e com habilidade podem realizar o procedimento, a necessidade da contenção física do animal, a cada procedimento de administração da substância, sua repetibilidade e o volume a ser administrado.

A Resolução Normativa Nº 33 do CONCEA em seu tópico *4.1. Principais vias de administração de substâncias*, descreve em seu primeiro parágrafo que "... através da administração orogástrica (gavagem), na qual a substância é introduzida pela boca e depositada diretamente no estômago."

É imprescindível termos uma leitura cuidadosa desse trecho. Quando é descrito que a substância *é depositada diretamente no estômago*, pelo menos em camundongos, a "agulha de gavagem" não pode ser inserida no estômago do animal.

O camundongo é uma espécie que não possui a capacidade de vomitar. Ele possui duas válvulas no estômago, a Cárdia e a Pilórica. O trânsito de alimentos obedece a abertura e o fechamento dessas válvulas. Quando o animal se alimenta a válvula cárdia se abre e a pilórica se fecha. Assim, o estômago fica repleto de alimento. Logo após há o fechamento da válvula cárdia e a abertura da pilórica, promovendo a continuidade do processo digestivo.

Após o fechamento da cárdia, não há um processo de reabertura natural para expulsão do material ingerido. Pode haver o fechamento concomitante de ambas as válvulas, o que ocasionaria a morte do animal. Contudo sem a possibilidade de abertura da válvula cárdia, o camundongo não realiza o vômito.

Então quando lemos "a substância é depositada diretamente no estômago" em camundongos, ocorre que a "agulha de gavagem" (sendo curva ou reta) deve ter o tamanho relativo ao animal que atinja a metade superiora do esôfago.

Quando há a administração da substância por pressão do volume na válvula cárdia ela naturalmente se abre e a substância é depositada no estômago e se fecha. Esse ponto é muito importante para confirmar o sucesso do procedimento.

Se após a aplicação, o animal apresentar a substância em sua cavidade oral, é que houve regurgitação. Isso significa que por algum motivo, não houve a abertura da válvula cárdia e a substância não foi depositada no estômago. Esse é um ponto crítico, pois pode haver o ferimento da região orofaríngea e a entrada de líquido nos pulmões, promovendo uma pneumonia aspirativa, e o animal evolui a óbito em torno de 24h.

VIA ENDOVENOSA (I.V.):

A via endovenosa é a mais eficiente para a administração de substância que não podem ser realizadas por via oral. Contudo, essas substâncias também devem ser seguras ao ponto de não provocar a inflamação do endotélio (tecido interno dos vasos) e no caso de extravasamento causar danos a outros tecidos.

A via endovenosa é indicada em animais de maior porte. Considerando ratos adultos, coelhos e primatas não humanos. Em animais de pequeno tamanho ela é extremamente delicada e somente pessoas com alta habilidade e treinamento conseguem realizar. Além disso, necessita de contenção física e o volume a ser aplicado deve ser reduzido. A vantagem é que essa é a via no qual a ação da substância aplicada ocorre de forma mais rápida.

VIA INTRAPERITONEAL (I.P.):

De forma geral é a via de administração de substâncias mais utilizada em animais de laboratório.

Realizada após a contenção física do animal, possui a similaridade na rapidez de ação da substância injetada quando comparada com a endovenosa. O volume injetado e repetibilidade é mais flexível do que a endovenosa e pode ser realizada, principalmente, após o treinamento da contenção física.

Esta é a via mais indicada para camundongos. Pelo seu pequeno porte e a dificuldade de realizar a endovenosa, a intraperitoneal é capaz de substituir na maioria dos casos a administração de substâncias pela via endovenosa.

Deve ser realizada, através da manipulação da seringa em "forma de caneta", se possível com a graduação em sua visão.

PASSO 1. No abdome do animal, traçar uma cruz, onde o melhor local de administração dessa via é o quadrante inferior direito do animal, próximo a região inguinal.

PASSO 2. Posicionar a seringa num ângulo de 30º e aspirar gentilmente para garantir que a agulha esteja na cavidade abdominal. Em seguida, injetar de forma suave, porém segura e precisa.

Antes de injetar, se prepare, pois, esse momento é crítico, onde a imobilização tem que estar sendo realizada com perfeição, pois no momento da injeção o animal se mexe e algumas pessoas se assustam. Também pode haver mordidas. Então nesse momento, se houver qualquer intercorrência, interrompa o procedimento, recoloque o animal na caixa e o principal, o manejo seguro da seringa mantendo a agulha longe de sua mão de imobilização do animal.

PASSO 3. Após a injeção, aguarde dois a três segundos para não haver refluxo da substância. Faça a assepsia do local e recoloque calmamente o animal na gaiola de forma com que esteja seguro e não irá pular da gaiola.

Alguns pontos críticos devem ser observados antes da realização desse procedimento:

- Treinamento e habilidade na contenção física do animal, de preferência na forma descrita, a imobilização para inóculo de agentes patogênicos, mesmo que a substância seja inócua;
- Realizar a preparação de todo material antes de iniciar o procedimento. Em todas as espécies, sempre utilizar o bom-senso de usar o calibre da agulha, o volume injetado, a possibilidade de injúria da substância ao peritônio.
- Realizar a alternância de lados do abdômen no caso da necessidade de aplicações repetidas;
- Observar o comportamento clínico/comportamental dos animais logo após a aplicação da injeção. No caso de haver estado de hiperatividade, vocalização ou agressividade, é um forte indício de dor abdominal, promovido pela substância ou pela aplicação errada.

SUBCUTÂNEA (S.C.) E INTRAMUSCULAR (I.M.):

As vias subcutânea e intramuscular são pouco utilizadas em pequenos animais de laboratório. A intramuscular, em espécies maiores pode, em alguns casos, substituir a endovenosa, contudo somente em espécies de maior porte.

A RN Nº 33 preconiza que essa via de administração deva ser realizada no dorso, flanco ou nuca. Contudo, gostaríamos de ressaltar que essas formas de realização da subcutânea possui um grande risco ao manipulador, principalmente tratando-se de camundongos. O animal fica, relativamente sem imobilização, e para fazer o "Triângulo Subcutâneo" o manipulador irá utilizar os dedos em pinça. A outra mão estará a seringa com a agulha que será aplicada. A proximidade entre a ponta da agulha e os dedos de contenção estão muito próximas, aumentando o risco de acidentes.

Na realização de administração de agentes biológicos de qualquer nível de biorrisco que coloque a integridade física do manipulador em risco, desencorajamos completamente essa forma de realização da via de administração subcutânea.

Sugerimos que a administração de agentes não patogênicos por via subcutânea seja realizada de forma similar a via intraperitoneal. As diferenças serão que a angulação da seringa será quase paralela a pele, não há necessidade de utilizar o quadrante inferior direito, e aplicar sob a pele o volume necessário. No caso de sucesso da injeção subcutânea o volume injetado irá promover uma pequena "bolinha" visível. Necessita de treinamento e habilidade, contudo indicamos fortemente para qualquer substância ou inóculo de agentes patogênicos que coloquem em risco de acidente biológico o manipulador.

A **intramuscular t**ambém não é uma via comumente utilizada na rotina de animais de laboratório de pequeno porte. Contudo possui uma velocidade de ação mais rápida do que a subcutânea e próximo a endovenosa. Alguns fatores comprometem a realização da via intramuscular na rotina de um biotério.

O local correto para a realização da intramuscular em roedores é a região caudal do músculo chamado de bíceps femoral (atrás da pata traseira). Então temos alguns riscos graves a possibilidade de promover o comprometimento do bem-estar animal: Em camundongos, esse músculo é muito fino, devendo ser utilizado seringas "de insulina" menores, com capacidade máxima de 300 microlitros, pois sua agulha é mais curta e mais fina. Pois a possibilidade de transpassar o músculo é relevante. No caso de um erro de administração, pode ser atingido um nervo chamado de Ciático. Atingir esse nervo promove uma dor lancinante no animal e dependendo da gravidade da lesão imobiliza o membro e pode causar acidente com o manipulador como mordeduras.

Há algumas variações, como a utilização do músculo femoral em sua porção cranial, realizar a tricotomia do local antes da realização do procedimento, a realização do procedimento com duas pessoas, uma realizando a imobilização do animal e a outra realizando a injeção.

Todas as vias possuem suas vantagens e desvantagens. Sugerimos realizar, antes de fazer o projeto para enviar a CEUA, refletir:

- A equipe está devidamente treinada e possui capacidade e habilidade para realizar com segurança para o manipulador e para o animal a via de administração;
- Relevar qual das vias oferece mais conforto ao animal. No caso de a equipe não estar treinada ao respectivo procedimento, mudar o protocolo, realizando o treinamento efetivo da equipe.

- Todos os membros da equipe devem estar capacitados a realização do procedimento, sendo que o mais hábil deve realizar o procedimento na rotina.
- Não trocar a via de administração durante o curso do ensaio. Os resultados serão diferentes.

Outras vias de administração menos comuns estão descritas na RN Nº 33 do CONCEA, como a intra-auricular, transdérmica, intradérmica, intratecal e intraocular. No material complementar você pode encontrar a íntegra da Resolução Normativa no 33 (CONCEA) em caso de necessidade consulte.

COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO – SANGUE:

A coleta de materiais biológicos como o sangue é um assunto, que mesmo descrito na RN Nº 33, ainda suscita alguns questionamentos. Não iremos entrar em controvérsia ou discussões sobre as vias de coleta preconizadas na legislação. Dessa forma, iremos sugerir as melhores formas de coleta de sangue no modelo mais utilizado e que possuímos mais experiência, de forma a estar em conformidade com a legislação nacional e minimizar o desconforto ou o comprometimento do animal.

A escolha da metodologia para coleta de sangue deve obedecer aos seguintes quesitos:

	Minimizar o desconforto do animal e ser realizada por manipuladores altamente treinados e experientes
	Estimar o volume e a repetibilidade necessária para a coleta de sangue de forma a atender o protocolo experimental e manter o bem-estar animal;
	Não mudar a metodologia de coleta de sangue durante a execução do ensaio, pois os resultados também irão mudar
	Realizar toda a coleta de sangue utilizando equipamentos de proteção individual, mesmo que não sejam animais infectados com agentes patogênicos

Em camundongos a mais comum é a coleta de sangue pela ponta da cauda, que vamos descrever:

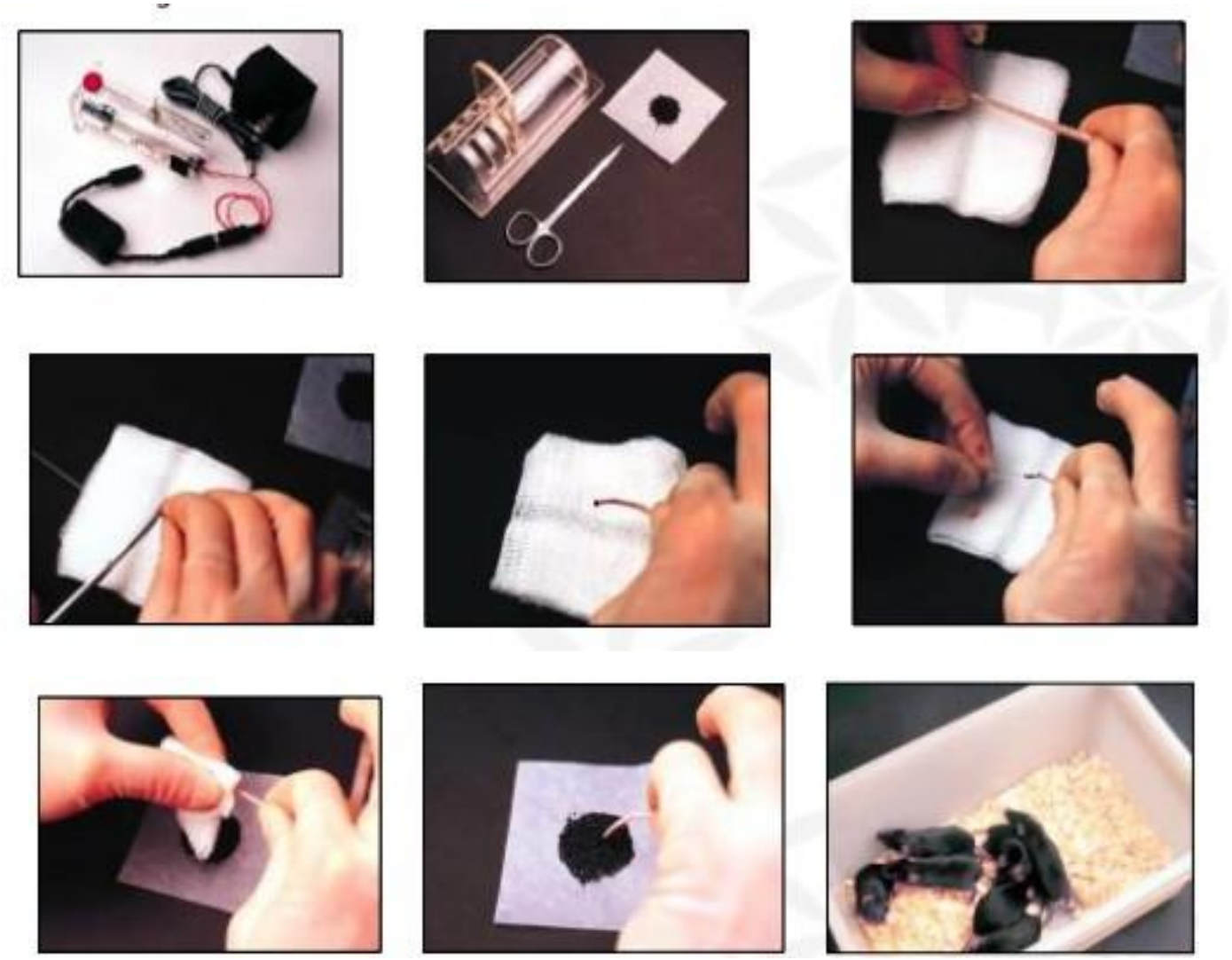
COLETA DE SANGUE PELA PONTA DA CAUDA	
VANTAGEM	**DESVANTAGEM**
ALTA REPETIBILIDADE	PEQUENO VOLUME

A coleta deve ser realizada utilizando as “caixas de contenção” para camundongos, colocando o animal suavemente dentro delas. Há um ponto prático importante nesse procedimento: nunca largue a ponta da cauda do animal, mesmo que ele já esteja contido, ele tende a “puxar” a cauda para dentro da caixa de contenção. Segurar com firmeza a base da cauda, porém sem que interrompa a circulação sanguínea e utilizando uma tesoura pequena oftalmológica realizar um pequeno corte na ponta da cauda do animal.

Nesse momento é onde o treinamento e a prática fazem toda a diferença para o bem-estar do animal. O procedimento correto é com os dedos em pinça que seguram a base da cauda do animal, massageiem suavemente a cauda, como se estivessem “empurrando” o sangue para a ponta da cauda.

Com a outra mão, o objeto de coleta de sangue já esteja preparado para receber a gota de sangue que irá se formar. Esse procedimento pode ser repetido várias vezes até conseguir o volume neces-

sário de sangue para o ensaio. Logo após, realizar a hemostasia física pela compressão do pico da cauda com uma gaze e aplicar nitrato de prata ou permanganato de potássio em pó para hemostasia química.



Coleta de sangue pela ponta da cauda: Descrevendo a sequência, primeiramente utiliza-se a "caixa de contenção" com aquecimento da base da cauda; separe todos os materiais; após a colocação do camundongo em contenção, realiza-se a imobilização da base da cauda; Realiza-se um pequeno corte na ponta da cauda; Após uma suave massagem é possível obter uma gota de sangue; Coleta-se imediatamente a gota de sangue; Através de uma gaze, se realiza a hemostasia por compressão. E logo após por permanganato de potássio. Recoloca o animal a gaiola de origem. Coleta de sangue pela ponta da cauda. Gabriel Melo de Oliveira, 2021

Não deve ser utilizado lâmpadas, agentes químicos ou gaze ou algodão embebido em água morna. Esse procedimento sendo realizado de forma correta e treinada possibilita a retirada máxima ao bem-estar do camundongo sem que esses recursos sejam aplicados. Além disso, no mercado há caixas de contenção que aquecem controladamente a base da cauda, essa pode ser uma alternativa para a coleta pela ponta da cauda.

PUNÇÃO CARDÍACA	
VANTAGEM	**DESVANTAGEM**
GRANDE VOLUME DE SANGUE	REALIZAÇÃO ÚNICA

A punção cardíaca também requer alto treinamento e habilidade. Preconizamos realizar a punção cardíaca, imediatamente após a confirmação de óbito do animal, ou seja, *post-mortem*.

Mesmo após a morte do animal o coração ainda apresenta um tempo em fibrilação e a pressão arterial diminui a cair, é nessa faixa de tempo (que não é extensa) onde se consegue realizar a punção cardíaca com sucesso.

Sugerimos a realização da seguinte forma, após a confirmação de óbito do animal pela parada dos movimentos respiratórios (ou algum método mais refinado) colocar o animal em decúbito dorsal, prendendo suas patas de forma a patas dianteiras estarem acima da cabeça, usar álcool 70% para melhor visualização e localização e há duas formas de coletar o sangue que demonstramos nas fotos abaixo. Realize a forma com que você tiver maior facilidade de se adaptar, pois assim você terá maior sucesso na quantidade de sangue coletado.

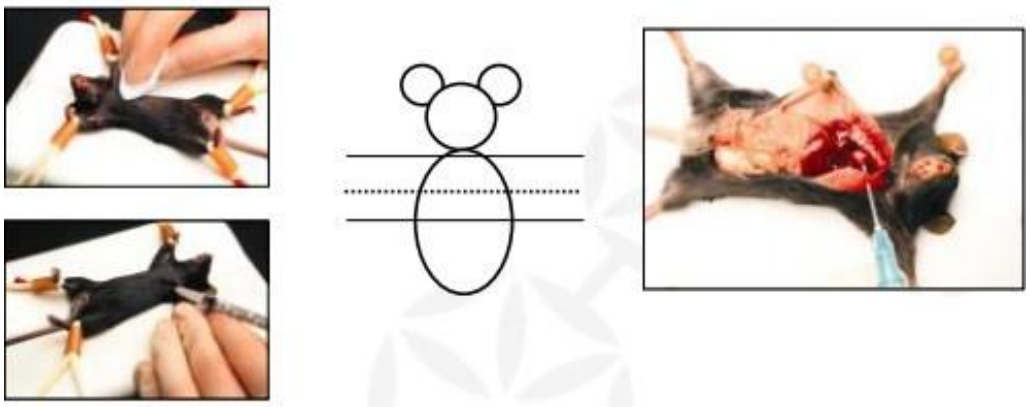


Figura 3: *Coleta de sangue pela punção cardíaca:* Após a confirmação do óbito do animal, imediatamente se realiza sua imobilização de forma (nessa forma, há outras) a coleta de sangue ocorre entre os espaços intercostais. Para atingir o lugar correto, se traça duas linhas imaginárias uma no pescoço do animal e outra no diafragma, no espaço intercostal entre essas duas linhas, é o local de inserção da agulha para a realização da punção cardíaca. Coleta de sangue pela punção cardíaca. Gabriel Melo de Oliveira, 2021

VEIA FACIAL [PLEXO FACIAL]
INTERMEDIÁRIA
Oferece uma quantidade maior de sangue do que a ponta da cauda, podendo ser repetida (com maior tempo de recuperação), porém o volume de sangue é inferior quando comparado a punção cardíaca

O uso da coleta de sangue pela veia facial é uma forma de não se utilizar a coleta de sangue pelo plexo orbital (método ao qual desencorajamos totalmente) e obter uma quantidade significativa de sangue de um mesmo animal em vários pontos.

Para a realização da coleta de sangue pela veia facial, o animal deverá ser imobilizado pela contenção física e na região da face, entre os olhos e as orelhas e acima de uma vibrissa única no maxilar do animal, se realiza um pico com uma agulha 11 x 0,4 mm.

Nesse momento, você deve estar preparado com seu objeto de coleta, pois a própria pressão venosa do plexo venosos irá expelir rapidamente uma gota significativa de sangue que deve ser coletada. Você pode massagear suavemente o local para a coleta do sangue. Naturalmente o sangue irá cessar, então realize a assepsia do local com álcool 70% e a hemostasia pela compressão com gaze.

Outras formas de coleta de sangue, preconizadas na RN Nº 33 são: veia auricular, veia caudal, *Sinus* retro orbital (plexo orbital), veia jugular e veia safena. Nossa experiência e observações podem sugerir que esses três métodos para camundongos, interferem minimamente no bem-estar dos animais e viabilizam a execução dos ensaios. Sugerimos mais estudos, para que técnicas e equipamentos sejam desenvolvidos de forma a utilizar a menor quantidade de sangue possível, ou utilizar outros fluidos corporais e oferecer.

No quadro abaixo um resumo para todas as espécies de metodologias para coleta de sangue:

Espécie	Preferencial	Volume/Repetição
Cobaia	Punção Cardíaca	Alto/Ausente
Hamster	Punção Cardíaca	Alto/Ausente
Camundongo	Amp. Cauda	Baixo/Diversas
	Veia Facial	Médio/ Moderadas
	Veia Safena	Médio/Moderadas
	Punção Cardíaca	Alto/Ausente
Coelho	Veia Auricular	Médio/Moderada
	Punção Cardíaca	Alto/Ausente
Rato	Veia Caudal	Médio/Moderada
	Punção Cardíaca	Alto/Ausente

CAPÍTULO 3 - RECONHECIMENTO DO ESTRESSE, DA DOR E DO SOFRIMENTO ANIMAL.

Esse capítulo é o mais desafiador e instigante desse bloco. Determinamos o Bem-Estar Animal, conceitos, definições e estudos estão à disposição.

Acreditamos que o bem-estar do animal está ligado a capacidade da espécie a se adaptar ao ambiente, aos procedimentos realizados nesses animais.

Tudo é muito instigante! Afinal, manter o bem-estar dos animais em laboratório é muito complexo. Infelizmente ainda não contamos com métodos substitutivos em larga escala e o estudo sobre o Bem-Estar Animal é reduzido, principalmente em relação ao refinamento das técnicas.

Isto nos leva a duas situações, testar e retestar conceitos já estabelecidos e estar sob a avaliação do que é sofrimento e bem-estar animal a partir da inferência pessoal de cada ser humano.

O desafio é buscar incessantemente estudar metodologias de substituição, redução, mas principalmente refinamento para minimizar o desconforto dos animais durante sua manutenção e os ensaios nos quais fazem parte do modelo experimental.

Outro ponto importante são as definições de estresse, bem-estar, comprometimento do bem-estar e sofrimento. Todas são válidas, pertinentes e prioritárias para o uso de animais para fins didáticos e científicos.

Vamos abordar esses temas de forma diferente, demonstrando a gênese do desconforto e do sofrimento, para que o entendimento desse processo, ajude a não ocorrer interpretações ou inferências errôneas e principalmente acreditamos que:

a) Somente o animal pode expressar quais são os insumos, materiais, equipamentos e procedimentos que promovam ou comprometam o seu bem-estar;

b) Consequentemente, devemos evitar inferências não testadas ou validadas para cada espécie em sua própria instituição e investir em metodologias de refinamento que possibilitem “traduzir” a expressão seja de bem-estar ou do comprometimento do bem-estar pelos animais.

O camundongo é uma espécie muito interessante. Seu bem-estar, primitivo, está ligado a facilidade na oferta de abrigo, alimento e acasalamento. Em biotérios, criação, manutenção e experimentação oferecemos isso a ele. A princípio esses animais possuem as condições para se manterem em bem-estar. Portanto, não é possível afirmar categoricamente que os camundongos em biotérios de manutenção estão em situação de bem-estar, porém como nestes ambientes proporcionam o que eles necessitam acredita-se que os animais não estão em situação de desconforto ou comprometendo do seu bem-estar.

Elevar o bem-estar desses animais... qual seria o tamanho da caixa ideal, a temperatura ideal, o número de animais por grupo ideal, o método de eutanásia ideal... todas as questões já possuem respostas. Contudo, devemos perguntar todas essas questões a eles de novo... Pois somente através da escolha ou da preferência do próprio animal será inquestionável que ele se encontra em bem-estar.

Então... hoje eu uso maravalha, mas a partir de amanhã usarei flocos de pinus. Conforme os trabalhos publicados é o material para cama ideal para o seu bem-estar. É importante ter um sistema no biotério que permita a escolha aos animais de estar numa caixa forrada com maravalha ou em outra caixa com flocos de pinus. Nenhum animal preferiu ficar na caixa com flocos de pinus. Qual resultado eu sigo? Eu sigo o que os animais me dizem. Os animais utilizam maravalha como piso/cama.

Mas há um ponto extremamente importante para todos os animais, sendo extremamente evidente nos camundongos: **Tempo de adaptação.**

Essa é a importância do conhecimento da genealogia e a filogenia dos animais. Podemos encontrar camundongos em climas árticos ou desérticos. Adaptaram-se... só um detalhe: em milhões de anos, ao ponto que em algumas situações desenvolveram subespécies, e continuam evoluindo em subespécies.

Então, dois pontos chaves para se falar de estresse e desconforto: Inferência do ser humano, sem relevar a escolha do animal e impor uma nova rotina sem o tempo necessário de adaptação a nova situação. Os estudos que possuímos, não reproduzem nossa realidade, nossos equipamentos, nossos insumos e são "janelas" de uma hipótese de trabalho. Podem ser úteis, mas como peças num contexto em que o mais importante são os nossos animais.

Estresse e desconforto em animais de laboratório:

Orientação da RN Nº 33 (CONCEA) foi atualizada pela normativa Nº 55 e revogada em 06 de dezembro de 2022 pela RN Nº 57, trata de procedimentos para minimizar o desconforto e o sofrimento ao modificar o comportamento sugere, em um dos seus principais pontos, como quesitos para o desfecho humanitário as seguintes situações:

1. A presença de lesões, doença ou alteração severa de comportamento durante a imobilização necessita remoção temporária ou permanente do animal do aparato;
2. Grupos ou pares sociais incompatíveis devem ser substituídos;
3. Animais que perdem mais do que 10% do peso corporal (de forma aguda) ou 15% do peso corporal (mais lentamente) com protocolos de acesso restritos a alimento ou água devem ser removidos do protocolo de pesquisa. Os critérios de desfecho para casos específicos devem ser justificados cientificamente e aprovados pelo comitê de ética para uso animal;
4. Animais apresentando sinais de desidratação, que incluam sede, secura das membranas da mucosa, produção reduzida de urina; consumo reduzido de alimento, perda de elasticidade da pele, letargia ou choque/colapso cardiovascular devem ser removidos da proposta em estudo;

É preciso observar que mesmo com uma grande a capacidade de adaptação ao estresse, em algumas situações o animal não consegue se adaptar aos fatores estressores extremos ao qual foi submetido.

Então a questão é o processo de tentativa de adaptação aos fatores estressores.

A espécie *Mus mus musculus*, ou como se acredita, a *Mus mus laboratorius*, possui um sistema de luta e fuga intrínseco à sua preservação. Então, o sistema de resposta e adaptação ao estresse será ativado rapidamente, dependendo do tempo e da intensidade do estímulo estressor. Dessa forma, deve-se ter cautela na interpretação numa única dosagem com altos níveis de corticosterona seja diagnóstico de dor e sofrimento.

É preciso analisar que a própria corticosterona possui a capacidade de feedback negativo no eixo de reação aos fatores estressores, em resumo seriam: 1) Fator estressor; 2) Ativação do eixo HPA com a liberação de Hormônio Corticotrófico (CRF); 3) Liberação de ADH e ativação do córtex da suprarrenal e, por conseguinte, liberação de corticosterona que irá atuar em diversas áreas do corpo, inclusive no cérebro e na neuromodulação a situação de estresse.

A dosagem de corticosterona sérica é diagnóstico de estado de estresse¿.

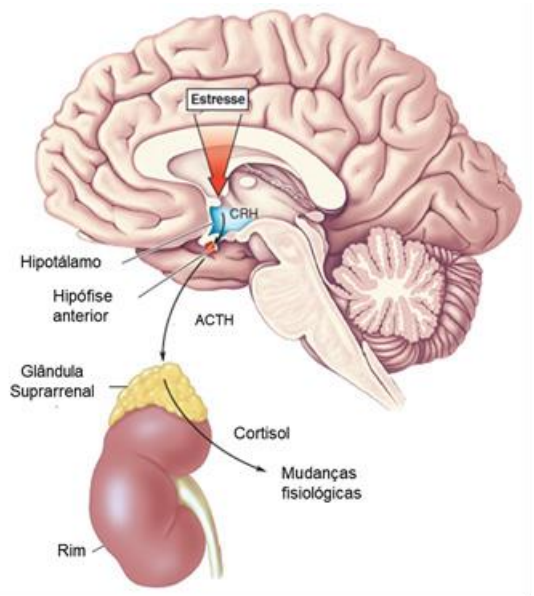


Figura 1: *Sistema de ativação de estresse:* O fator estressor, estimula o sistema rápido de luta e fuga, modulando os neurotransmissores a uma resposta rápida do organismo. No entanto, com a persistência do fator estressor, há o sistema de liberação de cortisol no ser humano (corticosterona nos animais) que irá desencadear uma série de eventos que tentarão fazer com que o sistema nervoso central e todo o organismo se adapte ao fator estressor. Adaptado de Cao, J.L. et al, 2010. Sistema de ativação de estresse. Adaptado de Cao, J.L. et al. Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressent action. J. Neurosci., v.30, p. 16453-16458, 2010.

https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/MGS%20Manual.pdf.

Uma das lacunas que existem na Ciência de Animais de Laboratório é o desenvolvimento de metodologias que monitorem o bem-estar ou o surgimento de desconforto e sofrimento nos animais.

Uma forma atual muito utilizada e indicada pelo *National Centre for the Repleacement, Refinement & Reduction of Animal Research* (NC3Rs) para avaliação principalmente de dor em camundongos (e ratos) é o Mouse Grimace Scale (MGS), onde é disponibilizado inclusive um manual.

Contudo, uma variação substancial entre as diferentes linhagens e entre os sexos nas pontuações da linha de base do MGS. Ao realizar a pontuação do camundongo “ao vivo” (no manual, sugere a utilização de filmagens), as pontuações de MGS são menores do que ao pontuar retrospectivamente a partir de filmagens.

São necessários mais estudos antes de considerar a implementação clínica deste método na avaliação da dor para estabelecer e validar totalmente as pontuações de linha de base para determinadas linhagens de camundongos

Atualmente estão disponíveis no mercado alguns equipamentos que são extremamente eficientes no monitoramento do bem-estar animal (BEA).

A maior vantagem desses equipamentos é a possibilidade de avaliar a condição clínica dos animais, em grupos, dentro de suas próprias gaiolas sem que haja necessidade de manipulação. Além disso, todos os resultados são traduzidos em um software específico, ao qual exclui qualquer possibilidade de subjetividade.

Outra forma muito interessante para avaliar o BEA de forma técnico-científica e preservando a dinâmica do grupo, ou seja, sem a manipulação dos animais, é o uso da telemetria.

O chamado *Kaha T elemeters* (ADinstruments – EUA) é capaz de registrar sinais com alta fidelidade, como pressão ventricular e arterial, atividade nervosa simpática e sistemas com biopotenciais como eletrocardiografia e oxigênio tecidual. Durante a execução deste trabalho não foi possível financeiramente a obtenção ou o aparelhamento de um biotério com esses equipamentos, possivelmente, pela falta de conhecimento da importância, e de investimentos, da CAL como ciência base de todas as outras ciências.

Apesar de sua imensa utilidade, sua extensão e sua falta de objetividade muitas vezes abrem algumas “lacunas” de questionamento. Dentre essas “lacunas” podemos chamar atenção principalmente para os quesitos relacionados aos *Desfechos Humanitários* (Eutanásia) e end-point.

A CAL é uma área da Ciência Biológica multidisciplinar. Várias profissões lidam diretamente com os animais e (totalmente compreensível) não receberam em sua graduação a capacitação para a avaliação clínica de animais, inclusive animais de laboratório. Então, facilitaria a esses profissionais (Médicos, Biólogos, Biomédicos e outros) a avaliação clínica dos indivíduos, e do grupo de camundongos, a aplicação de uma metodologia padronizada.

O End-Point é o momento em que os animais deverão ser retirados da pesquisa para preservação do seu bem-estar, principalmente nas questões relacionadas a dor. As formas com as quais conseguiremos atender ao end-point são: retirar o animal do experimento, controlarmos sua dor com analgésicos ou realizando a eutanásia.

A eutanásia é um tema altamente debatido e ainda sem consenso na CAL. Apesar da DBCA, do Guia e da Resolução Normativa 37, várias interpretações podem ser geradas para a sua aplicação em camundongos para fins científicos.

Podemos citar apenas 3 pontos não consensuais:

	Qual a melhor substância e/ou método para se realizar eutanásia em camundongos?
	Quais seriam os critérios técnico-científicos para aplicação dos métodos Recomendáveis e os Aceitos com Restrição?
	A eutanásia é realizada ao final do ensaio, ou com data pré-agendada?

Contudo, como identificar se um camundongo, em criação, manutenção ou experimentação está num ponto de sofrimento, estresse e dor irreversível que necessite ser realizado a eutanásia?

Resposta 1. métodos e substâncias deverão atender a RN 37 do CONCEA, sendo utilizados os métodos aceitos. Caso o estudo não permita a utilização desses métodos e substâncias o pesquisador deverá informar e demonstrar tecnicamente para a CEUA esta impossibilidade.

Resposta 2. Esses critérios deverão ser informados e demonstrados tecnicamente pelo pesquisador para que possam ser analisados pela CEUA.

Resposta 3. Aqui está sendo levantada a questão do end-point. As formas de determinação da quebra do bem-estar de um animal na pesquisa são: através da observação constante destes animais e estudos pilotos. Temos algumas escalas com padrões faciais indicativas de dor (Grimace Scale NC3Rs), sabemos que um animal com dor expressa isso com alterações comportamentais e de postura.

Eutanásia dos animais em sofrimento e dor:

Outro tema muito discutido e debatido. Qual o melhor método para realização de eutanásia em animais de laboratório. A Resolução Normativa (RN) Nº 37 do CONCEA, junto com a Diretriz Brasileira para Cuidados nos Animais de Laboratório (DBCA) descrevem diversas formas de realização de eutanásia, seus efeitos, vantagens e desvantagens. Na RN 37 [link] o CONCEA detalha todas as questões relacionada a eutanásia.

Animais com finalidade de criação e animais com finalidade de experimentação

Criação:

Setor onde temos as colônias de Fundação, Expansão e Produção. Onde os animais de laboratório são criados para serem fornecidos para experimentação.

A eutanásia desses animais engloba o descarta das matrizes e reprodutores que já atingiram o final da sua vida reprodutiva e dos excedentes de produção (aqueles animais que não atendem os requisitos do pesquisador sejam pelo sexo, idade e/ou peso).

Na criação, para eutanásia são permitidos os métodos aceitáveis (anestésicos injetáveis e inalatórios) e o CO2 (seguindo as recomendações em relação ao preenchimento da câmara de eutanásia). Toda metodologia deve ter aval da CEUA da Instituição.

Como na criação não temos o viés do que afeta ou não aos resultados do experimento devemos focar ainda mais nas questões relacionadas ao Bem-estar dos animais e dos operadores que irão executar a eutanásia. Do ponto de vista do operador o método deverá ser visualmente aceito e de fácil execução. Do ponto de vista do animal o método deverá causar rápida inconsciência, menores estresse e dor possíveis.

Uma discussão muito atual em relação ao CO2 (agente inalatório) e ao Isoflurano (anestésico inalatório) vem sendo levantada mundialmente. Existem os grupos que são a favor de um e contra o outro e vice-versa, não temos um consenso ainda. Os defensores do CO2 o fazem relacionado ao baixo custo, facilidade de utilização e que o bem-estar destes animais está preservado. Os contrários não acreditam na manutenção do bem-estar dos animais quando da utilização deste método.

No que concerne ao Isoflurano, os contrários à sua utilização acham um método caro, que o odor poderia causar uma repulsa inaceitável ao animal e que a contaminação ambiental poderia afetar ao operador de uma forma inaceitável. Já os favoráveis acham que a pouquíssima manipulação do animal, a inconsciência rápida que é produzida e a obtenção de um plano anestésico com consequente morte rápida atendem a todas as premissas da RN 37 do CONCEA. Já a questão da contaminação ambiental pode ser sanada com uma exaustão adequada da sala.

Experimentação:

Em consonância com as determinações da legislação nacional, os princípios éticos e o reduzido número de trabalhos relacionados ao bem-estar animal abordamos o complexo assunto da indução da eutanásia em camundongos, sintetizando a nosso estudo a três tópicos que consideramos primordiais para a realização da eutanásia nos animais minimizando a possibilidade da presença de dor, desconforto ou angústia.

Nossos resultados demonstram que a melhor metodologia para induzir a eutanásia no biomodelo camundongo durante seu uso para fins didáticos e científicos é pela utilização de uma câmara com ambiente saturado com Isoflurano 5% (através de uma gaze hospitalar embebida no líquido anestésico e protegido do contato do animal) e a insuflação de Dióxido de Carbono 1 L/min, inicialmente em 20% até 100% da área total da câmara, com a restrição do uso de um fluxômetro e da modificação da válvula de insuflação.

Contudo, as demais metodologias também possuem sua aplicabilidade. Sugerimos que para neonatos ou animais provenientes de colônias de criação o protocolo ideal consiste no uso de câmara com ambiente saturado com Isoflurano 10%, também embebido em gaze hospitalar e protegida do contato com os animais. Em relação aos anestésicos injetáveis, sugerimos a não utilização de Tiopental (150 mg/Kg) em camundongos e o uso da associação da sobredosagem de Cetamina (300 mg/Kg) e Xilazina (50 mg/Kg) pela via i.p. apenas em casos de Finalização Humanitária dos animais durante os ensaios. Porém não utilizar durante a realização dos ensaios, principalmente pela interferência direta e marcante nos sistemas biológicos.

O uso de Dióxido de Carbono, mesmo com uso de fluxômetro e a progressão de insuflação de 20 a 100% na câmara de eutanásia, não deve ser utilizada quando a válvula da câmara for a de padrão comercial e não houver a sua modificação em relação ao odor e ao ruído.

Por fim, acreditamos que esse trabalho pode acrescentar a ciência de animais de laboratório, demonstrando através de metodologias científicas pertinentes, que a indução da eutanásia deve utilizar materiais, metodologias e procedimentos que possibilitem a ausência de dor, desconforto e angústia ao animal, uma rápida dinâmica de óbito e um relativo baixo custo financeiro.

No biotério em que você é responsável há um animal (escolha a espécie) que apresenta alterações clínicas? Descreva essas alterações. Detectando que não há como manter no biotério, qual seria o seu procedimento? Descreva detalhadamente.

AVALIAÇÃO DO CURSO

Link para autoavaliação do aluno

https://forms.gle/gkASjUfCUv62TV2L8

Link para avaliação do curso

https://forms.gle/q8pukjtTgbmRqsxC8

LINKS DE VÍDEOS

https://www.youtube.com/watch?v=jVtHUbvnC-4

http://www.understandinganimalresearch.org.uk/resources/video-library/newcastle-university-research-improves-animal-conditions/

https://www.understandinganimalresearch.org.uk/resources/video-library/mice-into-clean-cages

https://qrgo.page.link/Xbo6K

https://qrgo.page.link/ZKkA9

LISTA DE TEXTOS

ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS.,(Org.). Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books. Disponível em https://static.scielo.org/scielobooks/sfwtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf

BRASIL. 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

BRASIL. 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

CARVALHO, André Luis de Lima.; WAIZBORT, Ricardo. Os mártires de Bernard: a sensibilidade do animal experimental como dilema ético do darwinismo na Inglaterra vitoriana scientiæ zudia, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 355-400, 2012. Disponível em https://www.scielo.br/j/ss/a/MqJcdsNv6MvrQzdxdZNvZPF/?lang=pt

COUTO, 2002. Criação e manejo de cobaias, In ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., (orgs.) Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. Disponível em https://books.scielo.org/id/sfwtj/pdf/andrade-9788575413869-12.pdf

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

FRAJBLAT, Marcel; AMARAL, Vera L. Lângaro; RIVERA, Ekaterina A.B. Ciência em animais de laboratório. Cienc. Cult., São Paulo , v. 60, n. 2, p. 44-46, 2008. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v60n2/a19v60n2.pdf

FERREIRA, W. M. et al. MANUAL PRÁTICO DE CUNICULTURA. 1. ed. Bambuí/MG – Brasil: Luiz Carlos Machado, 2012. Disponível em: https://docplayer.com.br/14776278-Manual-pratico-de-cunicultura.html

RAYMUNDO, Marcia Mocellin; GOLDIM, José Roberto. Ética da pesquisa em modelos animais. Disponível em https://revistabioetica.cfm.org.br/index.php/revista_bioetica/article/

viewFile/196/199

SANTOS, Belmira Ferreira dos. Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao Status Genético. Disponível em https://books.scielo.org/id/sfwtj/pdf/andrade-9788575413869-11.pdf

SHOMER, N H; HOLCOMBE, H; HERKNESS, J. E. Biology and Diseases of Guinea Pigs. Laboratory Animal Medicine. Disponível em https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/B9780124095274000067?token=48D61E0C2228E8CAFC782CCE3FC5AC89967E120F950BD96558EC742DBCF4BAFCA008E3D6D17B01BAB0F163B70C0E35C2&originRegion=us-east-1&originCreation=20220111162634

STIGAR, Robson. O pensamento Cartesiano. Disponível em https://www.webartigos.com/artigos/o-pensamento-cartesiano/5651/

LINKS IMPORTANTES

https://portal.fiocruz.br/sergio-arouca

https://www.arca.fiocruz.br/

https://biologo.com.br/bio/vivisseccao/

https://www.ceua.fiocruz.br/ceuaw000.aspx

https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea

https://www.jax.org/

https://www.researchgate.net/publication/236035967_Refining_rabbit_care_A_resource_for_those_working_with_rabbits_in_research

BIBLIOGRAFIA

AGHOVÁ T, KIMURA Y, BRYJA J, DOBIGNY G, GRANJON L, KERGOAT GJ (2018) Fossils know it best:Using new set of fossil calibrations to improve the temporal phylogenetic framework of murid rodents (Rodentia: Muridae) Mol Phylogenet Evol. (128):98-111.

ANDRADE, A. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro, RJ: Editora Fiocruz, 2002.

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

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. DE. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. [S.l.]: Editora FIOCRUZ, 2006

APPLEBY, M. C. et al. Animal Welfare, 2ª edição, Wallingford: Cabi, 2011.

AVMA. American Veterinary Medical Association. The AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition Disponível em: *https://www.avma.org › files › 2020-01 › 2020_Euthanasia_Final_1-15-20>.*

BALLS, M. et al. 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.

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.

BINSFELD, P. C. Caminho para 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.

BOIVIN GP, HICKMAN DL, CREAMER-HENTE MA, PRITCHETT-CORNING KR, BRATCHEr NA. Review of CO_2 as a Euthanasia Agent for Laboratory Rats and Mice. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2017 Sep 1;56(5):491-499. PMID: 28903819; PMCID: PMC5605172.

BOURSOT P, AUJFRAI JC, BRITTON-DAVIDIAN J, BONHOMME F (1993) The evolution of house mice Annu. Rev. Ecol. Syst. (24):119-52.

BRAGA, L. M. Três 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. 25-33.

BRASIL. 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: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/DBCA_RN.30.pdf>.

BRASIL. 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: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-33-de-18.11.2016-D.O.U.-de-21.11.2016-Secao-I-Pag.-05.pdf>.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa n° 15, de 16.12.2013. 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. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_15_de_16122013.html>

BRASIL. 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, 15 fev. 2018. Disponível em: < http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238684.pdf>. Acesso em Jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa no 37, de 15 de fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz de Eutanásia. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Anexo-Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea-.pdf>. Acesso em Ago. 2021.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. Resolução Normativa CONCEA no 33, de 18.11.2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa no 25, de 29 de setembro de 2015. Baixa o Capítulo "Introdução Geral" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2 out. 2015. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/33252781/do1-2015-10-02-resolucao-normativa-n-25-de-29-de-setembro-de-2015-33252777>.

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

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.

CAMPOS, J. D. DE S. et al. 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.

CAO, J.L. et al. Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressent action. J. Neurosci., v.30, p. 16453-16458, 2010.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 40, n. 03, p. 289 – 299, 2004.

CLIFFORD DH. Preanesthesia, anesthesia, analgesia, and euthanasia. In: Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, eds. Laboratory animal medicine. New York: Academic Press Inc, 1984;528–563.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO. Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, Brasília, DF, 26 Jan 2020. Disponível em: < http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238343.pdf>. Acesso em Jan. 2020.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO. Resolução Normativa Concea Nº 15. Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos, 2013.

COUTO, S. E. R. Criação e manejo de coelhos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. DE. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. 1. ed. [S.l.]: Editora FIOCRUZ, 2006. v. 1. p. 93–103

DA CRUZ REPOLÊZ, A. Divulgação da Ciência em Animais de Laboratório por meio de jogo de discussão: saberes e posicionamentos de alunos do ensino médio. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2018.

DIN W, ANAND R, BOURSOT P, DARVICHE D, JOUVIN-MARCHE E, et al. (1993) Origin and radiation of the house mouse. I.Clues from nuclear genes. Evolution (12): 36-39.

EVANGELISTA, A. A.; DA COSTA, S. M.; ROSSI, M. I. D.; OLIVEIRA, G. M. Wild Mice and Lab Mice. RESBCAL, São Paulo, v.6 n.2, p. 139-144, 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 Jan. 2020.

FERREIRA, W. M. *et al. MANUAL PRÁTICO DE CUNICULTURA*. 1. ed. Bambuí/MG – Brasil: Luiz Carlos Machado, 2012. Disponível em: <https://docplayer.com.br/14776278-Manual-pratico-de-cunicultura.html>. Acesso em: 3 jan. 2022.

FLYNN LJ (2015) Corrected placement of Mus-Rattus fossil calibration forces precision in the molecular tree of rodents. Sci Rep. 2015 28 (5):14444-14449.

FOUNDATION FOR BIOMEDICAL RESEARCH. Nobel-winning animal research leads to huge breakthroughs in science and medicine. Disponível em: https://fbresearch.org/medical-advances/nobel-prizes/.

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.

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

GARNETT N. PHS policy on humane care and use of laboratory animals clarification regarding use of carbon dioxide for euthanasia of small laboratory animals. Release date: July 17, 2002. Available at: grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-OD-02–062.html. Accessed Dec 14, 2010.

HAWKINS P, PLAYLE L, GOLLEDGE H, et al. Newcastle consensus meeting on carbon dioxide euthanasia of laboratory animals. London: National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Science, 2006. Available at: www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=416&page=292&skin=0. Accessed Jan 20, 2011.

HAWKINS, P. *et al. Refining rabbit care: A resource for those working with rabbits in research*. [S.l: s.n.], 2008.

HO SYW & DUCHÊNE, S (2014) Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. Mol. Ecol.

(23): 5747–5965.

HO SYW & PHILLIPS MJ (2009) Accounting for calibration uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times. Syst. Biol. (58): 367–80.

HUBRECHT, R. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals, 8th. edn.849p. pp. 380 - 398, 2010.

JACOBS LL (1977) A new genus of murid rodent from the miocene of Pakistan and comments on the origin of the Muridae. Paleo Bios (25): 1 - 11.

JACOBS, L.L., DOWNS, W.R., 1994. The evolution of murine rodents in Asia. Natl. Sci. Museum Monogr. (8): 149–156.

JURKIEWICZ, A. Adela Rosenkranz e a ciência de animais de laboratório. RESBCAL, São Paulo, v. 1, n2, p. 139 – 144, abr./ mai./ jun. 2012.

KIRKWOOD, J. K.; HUBRECHT, R.; UNIVERSITIES FEDERATION FOR ANIMAL WELFARE. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals edited by Robert Hubrecht and James Kirkwood.* 8th ed. ed. Chichester, West Sussex ; Ames, IA: Blackwell Pub, 2010.

KO, G. M.; LUCA, R. R.; DAMY, S. B.; MATTARIA, V. G. M.; OLIVEIRA, G. M. SBCAL/COBEA: 30 anos na defesa dos animais de laboratório. RESBCAL, v.2 n.1, p. 7-9, 2013.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. DE M.; MI KO, G. (EDS.). Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. DE M.; MI KO, G. (EDS.). Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2017.

MONTICELLI, P.F. Comportamento e comunicação acústica em cobaias e preás. 2005. 161f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MORSE HC . Origins of inbred mice. Academic Press Inc. New York, 1978.

PHIFER-RIXEY M, NACHMAN MW. (2015) Insights into mammalian biology from the wild house mouse Mus musculus. Elife. (15): 4 - 12.

MORIWAKI K, MIYASHITA N, SUZUKI H ,KURIHARA Y, YONEKAWA H (1986) Genetic features of major geographical isolates of Mus musculus. Curr Top. Microbial. Immunol. 1 (27): Berlin: Springer-Verlag. 395 pp.

MORIWAKI K , MIYASHITA N, YONEKAWA H (1985) Genetic survey of the origin of laboratory mice and its implication in genetic monitoring. In The Contribution of Laboratory Animal Science to the Welfare of Man and A nimals, ed. J Archibold, J Ditchfield, HC ROwsell, pp. 237-47.

MOURA, A. S. A. M. T.; MATTARAIA, V. G. DE M. Coelho. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. DE M.; KO, G. M. *Cuidados e manejo de animais de laboratório*. 2ª edição ed. [S.l.]: Editora Atheneu, 2017. p. 227–250.

NEELY, C. et al. 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.

NEVES, S. M. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2013.

NISHI, M. Effects of early-life stress on the brain and behaviors: Implications of early maternal separation in rodents. Int J Mol Sci. 2020 Sep 29;21(19):7212.

OLIVEIRA, G. M. O uso de camundongos da linhagem Swiss Webster: descrição das principais caraterísticas do modelo animal. 1. ed. Rio de Janeiro - RJ: PoloBooks, 2017.

OYOLA, M. G.; HANDA, R. J. Hypothalamic- pituitary- adrenal and hypothalamic- pituitary- gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. Stress. 2017 Sep;20(5):476-494

POILEY, S. M. A systematic method of breeder rotation for non-inbred laboratory colonies. Proceedings Animal Care Panel, v. 10, n. 4, p. 159–166, 31 mar. 1960.

POPOVA A.; TSVIRKUN, D.; DOLGOV, O. ANOKHIN, K.; ALBERTS, J.; LAGEREVA, E.; CUSTAUD, M. A.; GAUQUELIN-KOCH, G.; VINOGRADOVA, O.; ANDREEV-ANDRIEVKIY, A. Adaption to blood pressure telemetry system revealed by measures of activity, agility and operant learning in mice. J Pharmacol Toxicol Methods. 2017 May-Jun; 85:29-37.

POWELL K, ETHUN K, TAYLOR DK. The effect of light level, CO2 flow rate, and anesthesia on the stress response of mice during CO2 euthanasia. Lab Anim (NY) 2016;45:386–395.

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.

ROOD, J.P; WEIR, B.J. Reproduction in female wild guinea-pigs. F. Reprod. Fert. 1970; 23, 393-409.

ROWLAND, N. E.; TOTH, L. A. Analityc and interpretational pitfalls to measuring fecal corticosterone metabolites in laboratory rats and mice. Comp Med. 2019 Oct 1;69(5):337-349. DOI: 10.30802/AALAS-CM-18-000119.

SAGE RD. (1981) Wild mice. Evol. Theor.7 (81): 39-90.

SCHMID RD, HODGSON DS, MCMURPHY RM. Comparison of anesthetic induction in cats by use of isoflurane in an anesthetic chamber with a conventional vapor or liquid injection technique. J Am Vet Med Assoc 2008;233:262–266.

SHOMER, Nirah H.; HOLCOMBE, Hilda; HARKNESS, John E. Biology and Diseases of Guinea Pigs. In: Laboratory Animal Medicine. [s.l.]: Elsevier, 2015, p. 247–283. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095274000067.

SOHN, J.; COUTO, M. A. Chapter 8 - Anatomy, Physiology, and Behavior. In: SUCKOW, M. A.; STEVENS, K. A.; WILSON, R. P. (Org.). . *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. American College of Laboratory Animal Medicine. Boston: Academic Press, 2012. p. 195–215.

SUCKOW, M. A.; STEVENS, K. A.; WILSON, R. P. (Org.). *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. 1st edition ed. [S.l.]: Academic Press, 2011.

SUTHERLAND, S.D.; FESTING, M.F.W. The guinea - pig. In: The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, 6th edn Churchill Livingstone: Ed. Poole, T.B. pp. 393 – 410, 1987.

SUTHERLAND DR, SPENCER PB, SINGLETON GR, TAYLOR AC (2005) Kin interactions and changing social structure during a population outbreak of feral house mice. Mol Ecol. 14(9):2803-14.

THE JACKSON LABORATORY. Nomenclature of Inbred Mice. Disponível em: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/genetics-and-nomenclature/inbred-mice>. Acesso em: 11 dez. 2021a.

THE JACKSON LABORATORY. Nomenclature of Hybrid Mice. Disponível em: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/genetics-and-nomenclature/hybrid-mice>. Acesso em: 11 dez. 2021b.

THOMAs AA, FLECKNELL PA, GOLLEDGE HDR. COMBINING NITROUS OXIDE WITH CARBON DIOXIDE DECREASES THE TIME TO LOSS OF CONSCIOUSNESS during euthanasia in mice—refinement of animal welfare? PLoS One 2012;7: e32290.

VERONEZ, T.; BRÜCK, M.; ROSSI, M. I. D.; OLIVEIRA, G. Mouse Lab Behaviour: How to Listen to Their Preference During Maintenance in House Facilities. Open Acess Journaul of Biomedical Science, v.2 n. 5, p. 535 – 543, ago. 2020. DOI: 10.38125/OAJBS.000208. Disponível em: < https://biomedscis.com/fulltext/mouse-lab-behaviour-how-to-listen-to-their-preference-during-maintenance-in-house-facilities.ID.000208.php>.

VOSS LJ, SLEIGH JW, BARNARD JP, et al. The howling cortex: seizures and general anesthetic drugs. Anesth Analg 2008;107:1689–1703.

WANG, Y.; THATCHER, S. E.; CASSIS, L. A. Blood pressure monitoring using radio telemetry method in mice. Methods Mol Biol. 2017; 1614:75-85. Disponível em: < https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28500597/>. Acesso em: 29 jul. 2021.

WANNER, M. THE UNEXPECTED ADVANTAGES OF OUTBRED MICE IN RESEARCH. Disponível em: <https://www.jax.org/news-and-insights/2018/december/the-advantages-of-outbred-mice-in-research>. Acesso em: 11 dez. 2021.

WATANABE T, MIYASHITA N, MORIWAKI K, HILGERS J. (1987) Evolutionary relationships between laboratory mice and subspecies of Mus musculus based on the genetic study of pancreatic proteinase loci, Prt- I , Prt-2, Prt-3 and Prt-6. Biochem. Genet. 25 (239): 48-51.

YEADON, J. The difference between “germ free” and “specific-pathogen-free” mice. Disponível em: <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2013/may/the-difference-between-germ-free-and-specific-pathogen-free-mice>. Acesso em: 11 dez. 2021.