

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

Julia Terra de Araujo

ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL: SUA IMPORTÂNCIA PARA O BEM-ESTAR DOS
BIOMODELOS

Rio de Janeiro

2023

Julia Terra de Araujo

ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL: SUA IMPORTÂNCIA PARA O BEM-ESTAR DOS
BIOMODELOS

Projeto de Monografia apresentado à Escola
Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio –
Fundação Oswaldo Cruz (EPSJV-Fiocruz) como
requisito parcial para aprovação no Curso Técnico
em Biotecnologia.

Orientadoras: Cleide Cristina Apolinário
Borges – EPSJV/FIOCRUZ
Jenif Braga de Souza –
ICTB/FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2023

Julia Terra de Araujo

ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL: SUA IMPORTÂNCIA PARA O BEM-ESTAR DOS
BIOMODELOS

Projeto de Monografia apresentado como requisito
parcial para aprovação no Curso Técnico em
Biotecnologia.

Aprovado em __/__/__.

BANCA EXAMINADORA

Cleide Cristina Apolinário Borges
EPSJV/FIOCRUZ

Incerlande Soares dos Santos
ICTB/FIOCRUZ

Mônica Souza Ferreira Pinto
ICTB/FIOCRUZ

Flávia Coelho Ribeiro Mendonça
EPSJV/FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2023

*Dedico esse trabalho a Stuart e Remy,
meus ratinhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Diná, pelo amor e zelo incondicionais.

Agradeço ao meu irmão Lucas, por me manter com os pés no chão.

Agradeço ao meu namorado Max, pelo carinho e apoio contínuo.

Agradeço aos meus amigos: Giovanna, Gabrielly, Lucas e Fellipe Gabriel, por todos os momentos juntos.

Agradeço às minhas orientadoras Cleide e Jenif, por fazerem parte do projeto.

Agradeço à banca: Incerlande, Mônica e Flávia, por contribuírem com sugestões.

*"Não sei o sentido de
metade dessas palavras
compridas e, o que é
pior, nem acredito que
você saiba!"*

*(Lewis Carroll em
"Alice no País das
Maravilhas")*

RESUMO

A experimentação animal é uma parte importantíssima do desenvolvimento de diversas pesquisas e, apesar dos esforços para evitá-la ao máximo, ainda não existem métodos que substituam todas as pesquisas utilizando animais. Dessa forma, são aplicados padrões de qualidade e de cuidado dos animais para que sejam utilizados da melhor forma e a fim de minimizar seu distresse. O enriquecimento ambiental consiste em alterar as instalações dos animais de laboratório para promover um ambiente mais próximo ao habitat natural dos biomodelos, reduzindo os impactos negativos da pobreza ambiental no cognitivo e no emocional dos animais através de desafios e estímulos para que desempenhem suas necessidades etológicas, melhorando sua qualidade de vida. Esse projeto teve como objetivo estudar e compreender o enriquecimento ambiental, destacando sua importância para o bem-estar animal e a garantia da qualidade da pesquisa científica, o que foi feito a partir das seguintes etapas: descrever a importância dos biomodelos para a ciência e seus critérios de qualidade; estudar os princípios éticos da utilização de biomodelos em estudos científicos; e descrever os tipos de enriquecimento ambiental utilizados para os principais biomodelos empregados em pesquisas científicas. A metodologia proposta foi qualitativa, baseada em uma pesquisa de revisão bibliográfica. Esse projeto contribuirá com subsídios importantes para informação e conhecimento da prática do enriquecimento ambiental para manutenção e qualidade dos biomodelos.

Palavras-chave: Enriquecimento Ambiental. Animais de Laboratório. Instalações Animais. Ciência em Animais de Laboratório.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Camundongo em ninho de papel.....	12
Figura 2: Camundongo obeso comparado ao normal.....	12
Figura 3: Ratos fluorescentes	13
Figura 4: Grupo de ratos.....	14
Figura 5: Par de coelhos	15
Figura 6: Par de cobaias.....	16
Figura 7: Hamster	17
Figura 8: Gaiola Enriquecida.....	23
Figura 9: Camundongos alojados em conjunto	25
Figura 10: Pesquisador brincando com rato	25
Figura 11: Par de camundongos separados	26
Figura 12: Plataforma para ratos	27
Figura 13: Camundongo em tubo de papelão	27
Figura 14: Ratos em abrigos elevados	27
Figura 15: Camundongo em ninho	28
Figura 16: Rato em cima de abrigo	28
Figura 17: Rato dentro de abrigo	29
Figura 18: Rato recebendo petisco	30
Figura 19: Hamster roendo madeira	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. JUSTIFICATIVA	03
1.2. OBJETIVOS	04
1.2.1. OBJETIVOS GERAIS	04
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	04
2. METODOLOGIA	05
3. REVISÃO DE LITERATURA	06
3.1 IMPORTÂNCIA DOS PRINCIPAIS BIOMODELOS: CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS, GENÉTICAS E SANITÁRIAS	06
3.1.1. Classificação Quanto Ao Status Genético	07
3.1.2. Classificação Quanto Ao Status Sanitário	09
3.1.3. Características dos principais biomodelos	10
3.1.3.1. <i>O camundongo</i>	11
3.1.3.2. <i>O rato</i>	12
3.1.3.3. <i>O coelho</i>	14
3.1.3.4. <i>A cobaia</i>	15
3.1.3.5. <i>O hamster</i>	16
3.2. ASPECTOS ÉTICOS DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	18
3.2.1. Os 3 R's	19
3.2.2. As Cinco Liberdades	20
3.2.3. Legislação Brasileira	21
3.3. PRINCIPAIS DISPOSITIVOS UTILIZADOS COMO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL PARA OS BIOMODELOS	23
3.3.1. Classificação dos tipos de enriquecimento ambiental	24
3.3.1.1. <i>Enriquecimento Social</i>	24
3.3.1.1.1. <i>Enriquecimento Social Com Contato</i>	24
3.3.1.1.2. <i>Enriquecimento Social Sem Contato</i>	25
3.3.1.2. <i>Enriquecimento Físico</i>	26
3.3.1.2.1. <i>Complexidade</i>	26
3.3.1.2.2. <i>Ninho</i>	28
3.3.1.2.3. <i>Enriquecimento Sensorial</i>	29

3.3.1.2.4. <i>Enriquecimento Alimentar</i>	30
3.3.2. Validação dos Dispositivos de Enriquecimento Ambiental	31
4. CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

A experimentação animal já possibilitou inúmeros avanços científicos como o entendimento de diversos órgãos e processos biológicos (ASSIS et al., 2020), além de descobertas sobre doenças contagiosas e o desenvolvimento de vacinas (ANDRADE, 2006). Apesar de constantes pesquisas sobre novos métodos alternativos (como estudos in vitro e em culturas celulares), o modelo animal ainda é essencial para o estudo do organismo e sua complexidade (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). Dessa forma, aplicam-se rígidos controles genéticos, sanitários e de ambiente correspondentes às necessidades dos diferentes estudos. Essas padronizações são imprescindíveis para que possam ser gerados resultados confiáveis, com reprodutibilidade e credibilidade (HUBRECHT; KIRKWOOD, 2010). Dentre os biomodelos mais utilizados pode-se citar o camundongo, o rato, o coelho, a cobaia e o hamster, e cada um deles possui suas características específicas os fazem modelos adequados para diversos tipos de pesquisas (ANDRADE, 2006).

Durante a maior parte da história ocidental, existiram pouquíssimas discussões sobre as obrigações éticas dos seres humanos para com os outros animais (ROLLIN, 2006). Jeremy Bentham foi o primeiro a argumentar sobre o sofrimento animal, e influenciou a criação da primeira sociedade protetora dos animais, a Sociedade para a Prevenção da Crueldade Animal (Society for the Preservation of Cruelty to Animals) na Inglaterra em 1824. No entanto, foi apenas em 1876 que surgiu a primeira lei regulamentando a utilização de animais na experimentação científica, através do Ato Britânico sobre Crueldade Animal (British Cruelty to Animal Act) (MIZIARA, 2012). O primeiro debate sobre o bem-estar e a qualidade de vida dos animais de laboratório se inicia com Russel e Burch, no livro *The Principles of Humane Experimental Technique*, de 1959. Nele, os autores propõem uma visão mais humanitária dos biomodelos, a fim de eliminar ou ao menos reduzir o sofrimento infligido durante as pesquisas, enfatizando que a dor e o estresse do animal poderiam prejudicar a investigação (RUSSELL; BURCH, 1959).

Atualmente, no Brasil, existem algumas regulamentações sobre o uso dos biomodelos, mas deve-se destacar a Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 2008), regulamentada pelo Decreto nº 6.899 de 2009, à qual foram adicionadas diversas Resoluções Normativas, das quais vale realçar: N°32, N°50, e N°57 que definem diversos critérios para a criação, manutenção e utilização dos biomodelos (que inclui a promoção do enriquecimento ambiental e a disponibilização do espaço mínimo necessário para que o animal performe comportamentos

necessários ao seu bem-estar), além da regulamentação para as instalações animais (BRASIL, 1988) (CONCEA, 2018) (CONCEA, 2021) (CONCEA, 2022).

Para Yerkes (1925), se o animal em cativeiro não tiver a oportunidade de se empenhar pela sobrevivência, deve ao menos poder expressar diferentes reações diante de invenções e aparatos colocados em seu ambiente. Tanto Yerkes (1925) quanto Hediger (1950; 1969) apontam a influência do ambiente físico e social dos animais cativos no seu bem-estar. Qualquer tipo de enriquecimento ambiental baseado no conhecimento do habitat natural, fisiologia e comportamento da espécie tem como objetivo estimular comportamentos naturais, reduzir o estresse, aumentar as atividades físicas, e melhorar as condições de saúde e desempenho reprodutivo (PIZZUTTO, SGAI, GUIMARÃES, 2009). O programa de enriquecimento deve ser cuidadosamente elaborado e regularmente avaliado por pesquisadores e veterinários para garantir o benefício ao animal e o alinhamento com os objetivos da pesquisa, deve ser mantido atualizado de acordo com padrões mais recentes, e novas técnicas devem ser validadas antes de sua implementação nas instalações (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2010).

1.1. JUSTIFICATIVA

O enriquecimento ambiental é uma proposta de modificação das instalações de animais de laboratório, aumentando a complexidade do cotidiano do animal e evitando o estresse - complexo problema ético que permeia a utilização de biomodelos na ciência. Justifica-se a realização desse trabalho, com objetivo de mostrar os benefícios dessa técnica, que reduz um fator comprometedor para a saúde emocional e cognitiva desses animais, e, portanto, para a pesquisa. Algumas adições serão citadas a fim de mostrar que não precisam ser elaboradas ou custosas para promover o bem-estar.

Meu interesse por esse tema se deu graças aos ratos que tive de estimação: através deles, percebi a complexidade e inteligência desses animais, que conseqüentemente necessitam de constantes estímulos para se manterem felizes, ativos e curiosos. Durante as aulas de biomodelos na Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, descobri sobre a existência dessa alternativa para melhorar a qualidade de vida dos animais de laboratório, mas que ainda não era algo consistentemente implementado nos biotérios. Somando a curiosidade por esse tema ao meu amor por roedores, decidi que o enriquecimento ambiental no bem-estar dos biomodelos (especialmente camundongos e ratos) seria meu projeto de monografia.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL:

O objetivo geral é estudar e compreender o enriquecimento ambiental, destacando sua importância para o bem-estar animal e a garantia da qualidade da pesquisa científica.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Descrever a importância dos biomodelos para a ciência e seus critérios de qualidade;
2. Estudar os princípios éticos da utilização de biomodelos em estudos científicos;
3. Descrever os tipos de enriquecimento ambiental utilizados para os principais biomodelos empregados em pesquisas científicas;

2. METODOLOGIA

A metodologia dessa monografia foi qualitativa, baseada em uma pesquisa de revisão bibliográfica envolvendo a temática enriquecimento ambiental e seus benefícios para os biomodelos.

Como estratégia de pesquisa de revisão da literatura foi realizada uma busca por teses, dissertações e artigos científicos publicados em revistas indexadas do Brasil e do mundo nas bases de dados Lilacs, Scielo, Pubmed e BVs. E como fonte de informação foi utilizado o Google Acadêmico. Como referência, foram empregados os descritores: enriquecimento ambiental, animais de laboratório, ciência em animais de laboratório, instalações animais.

Esta monografia é composta por três capítulos:

No primeiro capítulo, é descrito a importância dos biomodelos para a ciência e os critérios de qualidade necessários na criação. No segundo capítulo, foi estudado os princípios éticos da utilização de animais em pesquisas. No terceiro capítulo, foram descritos os tipos de enriquecimento ambiental utilizados para os principais biomodelos empregados em pesquisas científicas; e abordados sua importância e seus benefícios.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 IMPORTÂNCIA DOS PRINCIPAIS BIOMODELOS: CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS, GENÉTICAS E SANITÁRIAS

A experimentação animal vem sendo utilizada desde os séculos IV e III a.C., tendo possibilitado diversos avanços como o entendimento diversos órgãos internos como a traqueia e os pulmões, a circulação sanguínea, respiração, nutrição e digestão de alimentos. (ASSIS *et al.*, 2020). Desde os primeiros estudos de Pasteur e Koch em bacteriologia no século XVIII, os animais de laboratório foram essenciais para apontar a causa das doenças contagiosas e para o desenvolvimento das primeiras vacinas contra carbúnculo e raiva. (ANDRADE, 2006)

Como o avançar dos séculos, no começo do século XX, o uso de modelos animais crescia dramaticamente enquanto multiplicavam-se as pesquisas sobre genética. (MAGALHAES, 2012).

Nesse momento, os animais utilizados ainda eram não-consanguíneos e, conforme os estudos se tonavam cada vez mais experimentais e menos observacionais, fez-se necessário compreender o fator da variabilidade genética nos estudos. (ERICSSON; CRIM; FRANKLIN, 2013)

Assim, com os estudos de Clarence Little, surge a primeira linhagem inbred, animais consanguíneos, denominada DBA. A obtenção desse tipo de padrão genético representou um grande salto para os estudos da herdabilidade do câncer e independência de seus diversos tipos nas famílias. Como consequência da seleção dos animais na construção de linhas consanguíneas, a frequência dos tipos de câncer se tornou previsível e esses foram incorporados no genoma dos animais.

A utilização dos animais inbred fez com que a pesquisa se tornasse mais confiável e reprodutível, além de reduzir a quantidade dos animais usados, e não só para a pesquisa do câncer, mas para diversas doenças que tinham suas próprias linhagens específicas (SANTOS, 2006). Sua importância é tão grande que foram utilizados por 70% dos ganhadores do Prêmio Nobel das áreas de fisiologia e medicina; e os 30% restantes tiveram como base os conhecimentos provenientes de estudos com animais. (DAMATTA, 2010)

Ainda sobre a importância dos biomodelos, a Medicina Translacional baseia-se na comparação de diferentes espécies para compreender o mesmo processo nos diferentes organismos. A pesquisa Biomédica básica utiliza-se da caracterização de genes e proteínas, do estudo de funções anatômicas e fisiológicas e do entendimento de estados normais e patológicos

de diversos animais; conhecimento que auxilia no estudo desses mesmos processos em humanos e vice-versa. (BRYDA, 2013)

Atualmente, apesar da constante busca por métodos alternativos (como estudos *in vitro* e em culturas celulares), o modelo animal ainda se faz necessário por possibilitar o estudo do organismo e sua complexidade. Com o advento das técnicas de engenharia genética, que permite realizar modificações no genoma dos animais, é possível mimetizar em modelos animais patologias, disfunções e malformações que ocorrem no ser humano, facilitando estudos específicos. (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007)

Diante de todo o histórico descrito acima, em toda parte do mundo surgiram organizações como a Federação das Associações Europeias de Ciências de Animais de Laboratório (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations - FELASA*) que tem por objetivo fazer recomendações - não regulatórias - baseadas em conhecimento científico sobre atividades relacionadas a animais de laboratório. Apesar de não estar associada a nenhum órgão governamental, alguns relatórios complementam brechas legais e servem de guia para o desenvolvimento das práticas que envolvem o uso de biomodelos em múltiplos aspectos, como: monitoramento sanitário, treinamento de profissionais, ética, e enriquecimento ambiental. Além disso, abrangem variadas espécies, desde roedores a lagomorfos. Por conta disso, a FELASA é fortemente respeitada e apoiada por diversas associações de Ciência de Animais de Laboratório (GUILLEN, 2012).

Com o avanço da ciência de animais de laboratório os biomodelos começaram a ser criados e mantidos sob rígidos controles genéticos, sanitários e de ambiente e começaram a ser classificados tanto sob o ponto de vista sanitário, quanto pelo genético. Essas padronizações são imprescindíveis para a obtenção de resultados confiáveis, reprodutibilidade dos experimentos e garantia da credibilidade. A seguir estão as classificações quanto ao status genético e sanitário. (HUBRECHT; KIRKWOOD, 2010).

3.1.1. Classificação quanto ao Status Genético

Os animais de laboratório podem ser divididos em dois grupos de acordo com seu status genético: *outbred*/heterogênicos/não-consanguíneos e *inbred*/isogênicos/consanguíneos. A esses últimos foram acrescentados os híbridos, os congênicos, os mutantes e os geneticamente modificados, como os transgênicos e Knockout (SANTOS, 2006). Um resumo do que representa cada um desses padrões genéticos está descrito abaixo:

OUTBRED (heterogênicos, heterocruzados, heterogâmicos ou não-consanguíneos): São animais com altos níveis de heterozigose entre os genes alelos, obtidos através de cruzamentos ao acaso, sendo úteis para simular populações próximas dos naturais e constituem a maior parte dos animais utilizados em pesquisas laboratoriais. (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005). Suas colônias devem ser grandes o suficiente para assegurar a heterogeneidade e variabilidade genética das colônias de reprodução, que podem ser comparadas com simulações computacionais, marcadores bioquímicos, marcadores de DNA etc. (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2010). Os acasalamentos devem ser realizados ao acaso para colônias com mais de 1000 casais, ou por sistemas de acasalamentos rotacionais, onde cada casal contribui com um novo casal para a próxima geração para garantir variabilidade genética e a heterozigose se mantenham inalterados. (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007)

INBRED (consanguíneo): São animais com alto nível de homozigose (99%) entre genes alelos, obtidos através de cruzamentos consanguíneos por 20 gerações entre irmãos, sendo o mais próximo de clones que se pode adquirir, o que reduz o número de animais utilizados em pesquisas comparativas de fatores ambientais ou experimentais. (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005). As linhagens são diferenciadas por um conjunto de características únicas compostas por genes de maior ou menor grau de influência ambiental. Para que essa homozigose seja garantida, os animais são mantidos com cuidados rigorosos a fim de minimizar a divergência genética (SANTOS, 2006) através de sistemas de acasalamento consanguíneo, com registros rigorosos e adequados, a fim de evitar, a contaminação por mutação ou combinação inadequada de pares. Por isso, é importante monitorar a autenticidade genética dos animais, o que pode ser feito por métodos, imunológicos, bioquímicos e moleculares. Diversas linhagens de animais foram desenvolvidas para atender as necessidades de pesquisas específicas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2010).

HÍBRIDOS: São animais de primeira geração (F1) obtidos através do cruzamento de duas linhagens consanguíneas diferentes, sendo geneticamente homogêneos e heterozigotos nos pares de genes em que as linhagens dos pais se diferenciam. Eles podem receber transplantes teciduais de ambas as linhagens (SANTOS, 2006), e seu vigor físico, longevidade e taxa de crescimento são maiores, enquanto mantêm a resposta imune condizente com as linhagens de origem. (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005)

INBRED RECOMBINANTES: são animais obtidos pelo cruzamento de híbridos de F1, gerando animais de segunda geração (F2), que são reproduzidos em cruzamentos

consanguíneos por 20 gerações. (SUCKOW; HASHWAY; PRITCHETT-CORNING, 2022). Cada linhagem de inbreds recombinantes é uma própria linhagem inbred, mas seu genótipo é constituído de uma recombinação dos genes das linhagens parentais. Esses animais são úteis para estudar a herdabilidade de uma característica em que duas linhagens se diferem (HUBRECHT; KIRKWOOD, 2010).

MUTANTES: São animais que sofreram mutações espontâneas ou intencionais (HUBRECHT; KIRKWOOD, 2010). Essas mutações podem originar uma nova linhagem inbred de interesse para estudos comparativos com o gene mutante. Esses animais são especialmente úteis para estudos oncológicos e de resposta humoral, além de componentes genéticos de outras doenças. (SANTOS, 2006)

TRANSGÊNICOS: São animais obtidos através da inserção estável do gene de outra espécie em seu genoma. É necessário observar os possíveis efeitos dessa modificação durante o desenvolvimento do animal, pois podem ocorrer alterações desconhecidas (HUBRECHT; KIRKWOOD, 2010). Os animais podem, inclusive, portar genes humanos, como os modelos de camundongo para a Esclerose Lateral Amiotrófica. (SUCKOW; HASHWAY; PRITCHETT-CORNING, 2022).

KNOCKOUT: São animais obtidos através da inativação de determinado gene pela manipulação do embrião ou de suas células-tronco por recombinação homóloga ou métodos como CRISPR. (SUCKOW; HASHWAY; PRITCHETT-CORNING, 2022)

3.1.2. Classificação quanto ao Status Sanitário

Ainda sobre a questão da reprodutibilidade dos dados quando utilizamos biomodelos, precisamos que estes tenham padrão sanitário adequado a pesquisa. Entende-se como status sanitário a relação do animal com sua microbiota específica e para cada arranjo desta temos uma classificação. Para garantir o status sanitário os animais devem ser monitorados quanto a presença e ausência de microrganismos com objetivo de garantir a reprodutibilidade e qualidade dos experimentos e, para isso, é necessário um controle cuidadoso da qualidade microbiológica e das barreiras sanitárias das instalações (HUBRECHT; KIRKWOOD, 2010). A microbiota inclui a microbiota externa (microrganismos superficiais, parasitas) e interna, e sua análise separa os animais nos seguintes grupos:

CONVENCIONAIS: São animais de biota indefinida, que não requerem ambiente de rígidas barreiras sanitárias. Em síntese, os animais que não se enquadram nos outros grupos são chamados de convencionais (COUTO, 2006).

GNOTOBIÓTICOS: São animais com biota conhecida, englobando também aqueles com biota conhecidamente não existente ou não detectável, se fazendo necessário o uso de equipamentos especializados com os isoladores e um sistema de barreiras sanitárias rígidas para sua criação (COUTO, 2006).

GERMFREE (GF): São animais livres de vida associada, também podendo ser denominados de axênicos. Sua obtenção exige cuidados específicos para evitar a contaminação antes mesmo do nascimento, através de histerectomia estéril na fêmea prenha, mantendo os filhotes em condições estéreis dentro de isoladores (HUBRECHT; KIRKWOOD, 2010). São subdivididos de acordo com a quantidade de espécies conhecidas em sua biota: monoxênicos, dixênicos, polixênicos. Por conta da dificuldade técnica e operacional que a manutenção desses animais apresenta, são quase sempre camundongos ou ratos (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005). Os GF são utilizados em pesquisas de câncer, imunologia, radiação, doenças entéricas, dentária, nutricional etc. (COUTO, 2006).

SPF: São animais livres de patógenos específicos (Specific Pathogen Free), a depender de qual ou quais espécies conhecidamente não estão presentes na sua biota (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005). São mantidos com barreiras sanitárias rigorosas – geralmente, na sua criação utiliza-se gaiolas do tipo ventilação individual em racks isoladores (COUTO, 2006). Os SPF são utilizados em testes de segurança de produtos e experimentos, onde não se quer interferências de microrganismos patogênicos (HUBRECHT; KIRKWOOD, 2010).

VAF: São animais SPF classificados de acordo com a conhecida ausência de uma carga antigênica específica (Virus Antibody Free) (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

3.1.3 Características dos Principais Biomodelos

Algumas características desejáveis, tais como a adaptação ao cativeiro e facilidade de criação e reprodução, fizeram com que determinadas espécies se destacassem como biomodelos. Os roedores, além de possuírem esses atributos, são dóceis, sociáveis, e adaptados a diversos ambientes, sendo, portanto, os animais mais utilizados em pesquisas científicas

(COUTO, 2006). A seguir, serão descritas as características dos principais biomodelos, sendo eles: o camundongo, o rato, o coelho, a cobaia, e o hamster.

3.1.3.1. O Camundongo

O camundongo (*Mus Musculus*) possui algumas características que o fazem preferível para a experimentação, justificando sua posição como o mais utilizado biomodelo: é um animal pequeno, de baixo custo, gestação breve, altamente prolífero, dócil e de genética muito conhecida (SANTOS, 2006) (LAPECHIK; MATTARAI; KO, 2009).

Suas características quanto ao ciclo de vida os fazem bons modelos para o estudo da genética, teratologia e gerontologia, e a alta reprodutibilidade é interessante para testes toxicológicos e carcinogênicos, que exigem dados de grandes grupos de animais. Atualmente foram desenvolvidas diferentes linhagens de camundongos que são capazes de melhor atender determinadas pesquisas: Maior susceptibilidade a determinados vírus e tumores é uma característica útil para os estudos da virologia e oncologia; Mutações que geram obesidade, diabetes, doenças autoimunes, entre outras, possibilitam estudos sobre essas doenças; Linhagens inbred bem caracterizadas são bons modelos para estudos de histocompatibilidade tecidual, colaborando com a pesquisa sobre transplante de órgãos (LAPECHIK; MATTARAI; KO, 2009).

Enfatiza-se sua importância para o estudo de doenças genéticas humanas, uma vez que sua genética é conhecida e similar ao ser humano (70 a 90% de similaridade do DNA codificador), pois permitem o acompanhamento do desenvolvimento de síndromes, o desenvolvimento de terapias gênicas e de novos medicamentos, além de descobertas sobre genes e fenótipos de interesse. Adicionalmente, é possível modificar facilmente seu genoma para facilitar estudos ou compreender patologias (LAPECHIK; MATTARAI; KO, 2009).

O camundongo de laboratório é parcialmente adaptado à vida em cativeiro, mas permanecem sendo animais ativos e altamente exploradores, que, em vida livre, passam grande parte do seu tempo procurando por uma grande variedade de alimentos. Eles constroem ninhos (FIGURA 1) e tocas elaborados e formam estruturas sociais complexas. O camundongo criado em instalações animais ainda tem interesse nesses comportamentos. Portanto, privá-lo da possibilidade de realizar seus comportamentos naturais de exploração, descanso, escalada, limpeza, busca por alimento, construção de ninhos e socialização pode causá-lo frustração e distresse, que será percebida por comportamento anormal (HUBRECHT; KIRKWOOD, 2010).

Figura 1: Camundongo em ninho de papel



Fonte: Brianna Gaskill (2012)

Dentre as diversas linhagens de camundongos, pode-se destacar o nude, o hairless, o obeso (FIGURA 2), o diabético, e o com distrofia muscular, que servem de modelo para patologias, disfunções e malformações humanas (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007)

Figura 2: Camundongo obeso comparado ao normal



Fonte: Catherine Chalmers [2011?]

3.1.3.2. O Rato

Os ratos (*Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*) apresentam vantagem com relação aos camundongos em algumas áreas, como pesquisa cardiovascular, comportamental e toxicológica, especialmente por conta do seu tamanho, que facilita procedimentos cirúrgicos e outros tipos de testes. Além disso, seu comportamento social e simula melhor o humano. Por exemplo, são bons modelos para a Síndrome do X Frágil, a causa mais comum de deficiência intelectual com fundo genético. Muitas linhagens de ratos foram desenvolvidas para servir de

modelo para doenças complexas como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (BRYDA, 2013).

Algumas linhagens de rato são populares por possuírem um gene repórter fluorescente em seu genoma, que faz com que suas células expressem uma proteína fluorescente observável por microscopia fluorescente (FIGURA 3). Essa particularidade é útil em estudos de transplantação e imunologia, visto que a medicina regenerativa, transferência de células adotivas e identificação de células geneticamente modificadas após terapia gênica requerem a habilidade de rastrear células em tecidos (BRYDA, 2013).

Figura 3: Ratos fluorescentes



Fonte: Catherine Chalmers [2011?]

As linhagens transgênicas também são de grande importância: vêm se popularizando os modelos humanizados de animais transgênicos que expressam genes humanos, como os ratos suscetíveis a doenças autoimunes devido à inserção do gene humano responsável pela histocompatibilidade, o HLA-B27. Dessa forma, esse modelo se tornou indispensável para o estudo de susceptibilidade a doenças relacionadas ao MHC (ERICSSON; CRIM; FRANKLIN, 2013).

Seu comportamento é fortemente determinado por sinais olfativos: reconhecimento de status social e reprodutivo, presença de predadores e feromônios de alerta de outros ratos, por exemplo. Além disso, emitem uma grande variedade de vocalizações ultrassônicas para comunicar estados emocionais, localizar parente e emitir avisos, e por isso podem ouvir sons completamente fora da capacidade humana. São animais noturnos e extremamente sociais, que não reagem bem ao isolamento, mas que respondem muito bem ao enriquecimento ambiental

(HUBRECHT; KIRKWOOD, 2010). A disponibilidade de material para ninho é importante para que possam criar espaços apropriados para descanso e reprodução. (BAUMANS, 2005)

A maior parte das linhagens de ratos de laboratório são albinas ou derivadas de uma (FIGURA 4). As seguintes linhagens são frequentemente utilizadas: Swiss, Wistar albino, Sprague-Dawley albino, e Long-Evans hooded (HUBRECHT; KIRKWOOD, 2010).

Figura 4: Grupo de ratos



Fonte: Animal Welfare Body Utrecht (2022)

3.1.3.3 O Coelho

Os coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) apresentam as vantagens de serem animais dóceis e fáceis de manusear e observar, comuns, de baixo custo em comparação com animais de maior tamanho, e de ciclos vitais (gestação, lactação e puberdade) curtos (MAPARA; THOMAS; BHAT, 2012). Além disso, são grandes o suficiente para permitir monitoramento de mudanças fisiológicas de forma não-letal, o que os faz preferíveis para estudos sobre o metabolismo lipoproteico, aterosclerose, hipertrofia cardiomiopática e pesquisa cardiovascular.

Os coelhos são mais próximos na escala filogenética dos primatas do que dos roedores, e suas linhagens possuem um background genético mais diversificado que linhagens inbred e outbred de camundongos, o que é uma vantagem para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, já que simulam melhor a diversidade genética humana (BOSZE; HOUDEBINE, 2006). São comumente utilizados em teste de alérgicos em geral, como irritantes cutâneos primários, rubefacientes, fotossensibilizadores e irritantes dos olhos por conta de sua hipersensibilidade (COUTO, 2006).

Quanto ao comportamento, são animais noturnos e sociais, com fortes instintos de presa - quando se sentem ameaçados, podem ficar paralisados ou tentar fugir e se esconder.

Normalmente passam muito tempo limpando a si mesmos e outros coelhos, o que é um comportamento normal, assim como o de esfregar rapidamente os dentes e mexer os bigodes, o que fazem quando estão contentes (não deve ser confundido com bruxismo, que indica dor). Coelhos são territoriais e inteligentes, sendo capazes de reconhecer não só ambientes, como outros coelhos e inclusive humanos. Por serem animais sociais (FIGURA 5), podem expressar comportamentos anormais quando mantidos isolados (VALENTINE; DAUGHERITY; MAURER, 2012).

Figura 5: Par de coelhos



Fonte: University of Michigan (2018)

3.1.3.4. A Cobaia

As cobaias (*Cavia Porcellus*) são animais dóceis, sociais e fáceis de manusear, mas são extremamente vulneráveis a estímulos estressantes, principalmente ambientais, o que faz com que exijam muito cuidado. Além disso, são muito sensíveis a toxicidade por antibióticos como tetraciclina, penicilina e cloranfenicol. São muito utilizadas em estudos sobre nutrição, farmacologia, imunologia, radiologia, alergia, carência de vitamina C, e testes de reativos biológicos. As cobaias são os biomodelos de eleição para obtenção do “complemento” necessário em muitas reações imunológicas de “fixação do complemento” (COUTO, 2006). Muitas linhagens de cobaia já foram descritas, mas poucas são utilizadas na pesquisa, sendo as mais comuns a short-haired American e a Inglesa (CLEMONS; SEEMAN, 2018).

As cobaias (FIGURA 6) selvagens geralmente vivem em grupos pequenos, com uma forte estrutura de hierarquia, e podem brigar entre si para reforçá-la. No entanto, costumam ser sociáveis, comunicando-se por vocalizações variadas (VALENTINE; DAUGHERITY;

MAURER, 2012). Não possuem o hábito de construir ninhos (na natureza, utilizam tocas feitas por outros animais), mas não gostam de espaços abertos e por isso devem ter acesso a abrigos adequados, como caixas e tubos. (BAUMANS, 2005)

Figura 6: Par de cobaias



Fonte: The Scientist, (2015)

3.1.3.5. O Hamster

O hamster (*Mesocricetus auratus*) possui algumas características que o fazem um modelo interessante, como: suas as bolsas guturais presentes nas bochechas que podem ser facilmente reviradas e examinadas, seu maior tamanho com relação aos camundongos, sua relativa falta de patógenos naturais, apesar de serem suscetíveis a diversos patógenos experimentais, capacidade de aquisição de uma variedade de doenças genéticas similares com condições humanas, desenvolvimento de tumores incomuns em outros biomodelos, e possibilidade de indução a doenças metabólicas por manipulação da dieta. Seu comportamento é utilizado como base para o estudo dos efeitos de tratamento em machos agressivos e com hábitos defensivos (VALENTINE; DAUGHERITY; MAURER, 2012).

Hamsters (FIGURA 7) são animais noturnos, que geralmente vivem sozinhos, mas uma mãe pode conviver com os filhotes. Nas gaiolas, quando mantidos em grupo, podem brigar caso não tenham sido socializados desde cedo, mas o enriquecimento ambiental pode reduzir a agressividade. Os hamsters costumam construir ninhos (especialmente fêmeas prenhas ou lactantes) e acumular comida, e passam boa parte do seu tempo dormindo (VALENTINE; DAUGHERITY; MAURER, 2012).

Figura 7: Hamster



Fonte: Burgess (2024)

3.2. ASPECTOS ÉTICOS DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A utilização de animais em pesquisas possui um longo histórico, com registros datados desde a Grécia Antiga. Inicialmente, as práticas em investigações biológicas baseavam-se no que se chama hoje de Patologia Comparada, a comparação de órgãos doentes de humanos e animais (MIZIARA et al., 2012). Enquanto a religião e a ciência não possuíam uma divisão clara, os animais eram utilizados em experimentações que eram proibidas em seres humanos, por serem considerados “desprovidos de alma”. Essa prática foi potencializada no período Renascentista, conforme a popularização do antropocentrismo: todos os seres deveriam servir à espécie humana e, portanto, morrer pela ciência (GUIMARÃES et al., 2016).

O auge da experimentação animal foi atingido no período do racionalismo moderno, quando René Descartes (1596-1650) formulou a Teoria Mecanicista, que dizia que, já que apenas o ser humano é dotado de alma, é o único capaz de pensar e sentir. No caso dos animais, todos os seus movimentos, barulhos, e reações seriam análogos ao funcionamento padrão de uma máquina. Suas respostas à dor seriam apenas um indicador de que essa máquina teve o funcionamento comprometido, como o ranger de engrenagens em um relógio (BAEDER et al., 2012).

Durante a maior parte da história ocidental, quase não existiram discussões sobre as obrigações éticas dos seres humanos para com os outros animais, e menos ainda regulamentações, salvo contra a crueldade excessiva. Ainda assim, quando existiam, não retratavam os animais como objetos diretos de preocupação moral, mas focavam nos seus efeitos em humanos. Tomás de Aquino (1225-1274) e Immanuel Kant (1724-1804) se opunham à violência animal apenas baseando-se no princípio de que esta poderia evoluir para a violência contra o homem (ROLLIN, 2006).

O filósofo e jurista Jeremy Bentham foi o primeiro a argumentar sobre o sofrimento animal, utilizando como base sua própria teoria utilitarista, que defende que a integridade de uma ação é proporcional ao seu benefício para todos os seres dotados de sensibilidade, e não só o ser humano, e que o sofrimento deve ser levado em consideração independente do ser em que ocorre. Cita em sua obra *Uma Introdução aos Princípios da Moral e da Legislação*: “O foco não é saber se os animais podem raciocinar; tampouco se podem falar; o verdadeiro problema é: eles podem sofrer?” (PALMER; SANDØE, 2011). Seu pensamento influenciou a criação da primeira sociedade protetora dos animais, a Sociedade para a Prevenção da Crueldade Animal (Society for the Preservation of Cruelty to Animals) na Inglaterra em 1824. Ainda assim, a primeira lei que, de fato, regulamenta a utilização de animais na experimentação científica surge

apenas em 1876 através do Ato Britânico sobre Crueldade Animal (British Cruelty to Animal Act). Nesse ponto, porém, estabeleceram-se somente padrões mínimos para o manejo desses animais, sem contemplar sua qualidade de vida (MIZIARA, 2012).

3.2.1 Os 3 R's:

O primeiro debate sobre o bem-estar dos animais de laboratório se inicia com Russel e Burch, no livro *The Principles of Humane Experimental Technique*, de 1959. Nele, os autores propõem uma visão mais humanitária dos biomodelos, para que se eliminasse ou reduzisse o sofrimento infligido nas pesquisas, ressaltando que os fatores indesejáveis de dor e estresse poderiam afetar negativamente a investigação. Seus princípios foram resumidos em 3 R's (RUSSELL; BURCH, 1959):

- i) substituição (*replacement*) – troca de modelos animais por modelos não sencientes ou incapazes de sentir dor, ou por modelos inferiores na escala filogenética;
- ii) redução (*reduction*) – quando for impossível eliminar completamente a necessidade dos modelos animais, reduzi-los ao menor número que ainda alcance os objetivos traçados, com resultados estatisticamente significativos;
- iii) refinamento (*refinement*) – evitar o estresse e maximizar o bem-estar.

Os autores dividem o princípio de substituição em: relativa, em que os animais ainda sejam utilizados, mas não sejam expostos a nenhum tipo de distresse decorrente do experimento; e absoluta, em que nenhum animal seja utilizado. Dentre os métodos alternativos, pode-se citar: armazenamento, troca e uso de informações provindas de experimentos anteriores para evitar a repetição desnecessária de testes em animais; uso de técnicas físicas e químicas; predições baseadas em propriedades moleculares; uso de modelos matemáticos e computadorizados; uso de organismos com consciência limitada, como plantas e microrganismos; e uso de métodos *in vitro* (BALLS, 1994).

Os testes que antecedem a experimentação animal podem ter resultados valiosos para a redução do número de animais necessários. Por exemplo, culturas de células de fígado humano podem fornecer informações sobre como uma droga seria metabolizada e eliminada pelo corpo. Incluir tal teste nas primeiras fases do desenho do experimento ajuda a descartar componentes

inválidos, minimizando a necessidade de animais em etapas posteriores (DOKE, DHAWALE, 2015). Existem evidências de que experimentos mal planejados e análise estatística inapropriada dos resultados levam ao uso ineficiente de animais e recursos na pesquisa toxicológica. Estudos anteriores de métodos estatísticos utilizados em outras áreas da pesquisa biomédica revelam descobertas semelhantes. Portanto, o entendimento de desenho experimental e estatística são necessários para reduzir o número de animais que serão utilizados (ZURLO, RUDACILLE, GOLDBERG, 1996).

Instalações para animais de laboratório vêm sendo planejadas primeiramente de acordo com requerimentos higiênicos, econômicos e ergonômicos, com pouca ou nenhuma consideração pelo bem-estar animal (BAUMANS, 2005). Comportamentos anormais, medo ou estresse ocorrem quando os animais estão alojados em ambientes onde não podem performar ações que seriam essenciais para a sobrevivência na natureza, ou ações que corrigiriam certo desequilíbrio homeostático que estejam experienciando (OLSSON, DAHLBORN, 2002). Em roedores de laboratório, sinais de mal-estar foram associados a condições como isolamento social (ex.: animais em gaiolas solitárias), conflito social inevitável (ex.: animais sem meios de evitar contato ameaçador), falta de meios para se proteger de estímulos indesejados (ex.: esconderijo da luz ou barulho), falta de material para ninho (ex.: para se esconder ou regular a temperatura), privação motora ou sensorial por conta da falta de estímulos sociais ou inanimados. Dessa forma, justifica-se a necessidade de alguma forma de enriquecimento ambiental para melhorar o bem-estar desses roedores (WÜRBEL, GARNER, 2007).

A definição de bem-estar por si só não é clara e é motivo de divergência. Na maior parte da literatura, o termo é usado para designar a ausência de estresse e sensações negativas. Em uma visão mais contemporânea, bem-estar não se limitaria a eliminação do desconforto, mas a promoção de sensações positivas de conforto, prazer e felicidade (TANNENBAUM; BENNETT, 2015).

3.2.2 As Cinco Liberdades:

Numa tentativa de aprimorar os 3 R's para melhorar a qualidade de vida dos animais de produção, no Comitê de Brambell em 1965, W. H. Thorpe, etnologista da Universidade de Cambridge enfatiza que é necessário entender a biologia dos animais e suas necessidades biológicas, incluindo comportamentais; e que a falha em as prover lhes causaria frustração. No Relatório de Brambell, esse conceito foi nomeado "As Cinco Liberdades" (BROOM, 2011):

- i) livre de sede e fome;
- ii) livre de dor, ferimentos e doenças;
- iii) livre de desconforto;
- iv) livre de medo e estresse;
- v) livre para expressar seus comportamentos naturais.

Esses comportamentos incluem, mas não são limitados a: atividades focadas no ambiente, de exploração e aquisição de alimento (coleta ou caça); atividades interativas de conexão com outros animais; cuidado dos filhotes por parte dos pais ou do grupo; brincadeiras; e atividade sexual, que geram no animal sentimentos de conforto e prazer. A compreensão desse princípio reforça a proposta de oferecer ambientes enriquecidos aos animais (MELLOR, 2016).

3.2.3 Legislação Brasileira:

A Lei de Vivissecção (Lei Federal nº 6.638 de 1979) foi a primeira a estabelecer normas para a vivissecção de animais em práticas didático-científicas no Brasil e critérios para sua execução, mas não chegou a ser regulamentada e, portanto, não aplicada (REZENDE, 2008).

Em 1988, o artigo 225 da Constituição Federal, parágrafo 1º, inciso VII impõe a obrigação de proteger a fauna e a flora vedando práticas que coloquem em risco sua função ecológica, provoquem a extinção de espécies ou submetam os animais à crueldade (OLIVEIRA et al., 2018).

Criado em 1983, o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (atualmente Sociedade Brasileira de Ciência de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL), publica, em 1991, 12 artigos: os Princípios Éticos na Experimentação Animal, a fim de nortear os profissionais envolvidos no uso de biomodelos (OLIVEIRA et al., 2018).

Atualmente, vigora a Lei de Crimes Ambientais (Lei nº 9.605, de 1998) regulamentada pelo Decreto nº 3.179, de 1999, que proíbe, no artigo 32, parágrafos 1º e 2º, experiências dolorosas ou cruéis em animais vivos, mesmo que com fins didáticos ou científicos quando existirem métodos alternativos, com pena agravada em caso de morte do animal. Percebe-se a aplicação parcial do conceito de substituição (*replacement*) de Russel & Burch (REZENDE, 2008).

No entanto, uma grande conquista foi alcançada com a aprovação da Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 2008), regulamentada pelo Decreto nº 6.899 de 2009, que estruturou o Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), ligado ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC). Este criou o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA), para gerenciar instituições; definir os procedimentos para o uso de modelos animais na atividade didática e científica; e determinar as normas de funcionamento das Comissões de Ética em Uso Animal (CEUAs) (OLIVEIRA et al., 2018). Os membros dos Comitês de Ética são responsáveis pela conciliação dos aspectos éticos com interesses científicos, econômicos, legais e comerciais (SCHNAIDER, SOUZA, 2003).

À Lei Arouca, foram adicionadas diversas Resoluções Normativas, das quais destacam-se: N°32, N°50, e N°57 que, respectivamente, definem boas práticas para produção, manutenção e utilizações de animais em atividades de ensino e pesquisa científica (que inclui a promoção do enriquecimento ambiental e a disponibilização do espaço mínimo necessário para que o animal performe comportamentos necessários ao seu bem-estar); dispõem critérios de regulamentação para as instituições que produzem, mantêm ou utilizam animais em atividades de ensino e pesquisa científica; e determinam as condições necessárias para a criação manutenção e experimentação de roedores e lagomorfos mantidos em instalações de ensino e pesquisa científica (BRASIL, 1988) (CONCEA, 2018) (CONCEA, 2021) (CONCEA, 2022).

3.3. PRINCIPAIS DISPOSITIVOS UTILIZADOS COMO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL PARA OS BIOMODELOS:

Como o animal em cativeiro possui suas necessidades básicas facilmente supridas, não precisa trabalhar pela sobrevivência. O resultado é um estado constante de tédio por não poder expressar seus comportamentos naturais. A vida em um ambiente empobrecido durante períodos prolongados reduz a atenção e curiosidade do animal, que por sua vez pode se desenvolver problemas cognitivos e emocionais. O enriquecimento ambiental busca promover um ambiente mais próximo ao habitat natural dos biomodelos, além de desafios e estímulos para que desempenhem suas necessidades etológicas, melhorando sua qualidade de vida (BOERE, 2001).

De outro modo, para Yerkes (1925), se o animal em cativeiro não tiver a oportunidade de trabalhar para sobreviver, deve ao menos poder exercitar diferentes reações diante de invenções e aparatos colocados em seu ambiente (FIGURA 8). Tanto Yerkes (1925) quanto Hediger (1950; 1969) reconheceram a influência do ambiente físico e social dos animais cativos no seu bem-estar. Qualquer tipo de enriquecimento ambiental baseado no conhecimento do habitat natural, fisiologia e comportamento da espécie tem como objetivo estimular comportamentos naturais, reduzir o estresse, aumentar as atividades físicas, e melhorar as condições de saúde e desempenho reprodutivo (PIZZUTTO, SGAI, GUIMARÃES, 2009).

Figura 8: Gaiola Enriquecida



Fonte: RISE (2019)

Os benefícios cognitivos da exposição a ambientes enriquecidos vêm sendo estudados desde a década de 60, seja em animais saudáveis ou adoecidos, jovens ou idosos. Entre eles, pode-se citar: maior peso cerebral e espessura do córtex, aumento de neurotransmissores, maior atividade, melhor memória, e redução da agressividade (GARBIN, FALEIROS, DO LAGO, 2012).

3.3.1. Classificação Dos Tipos De Enriquecimento Ambiental:

O enriquecimento deve fazer parte de um programa criticamente e regularmente avaliado por pesquisadores e veterinários para assegurar que de fato beneficia o animal e que é coerente com os objetivos da pesquisa, além de mantê-lo atualizado de acordo com os conhecimentos mais atuais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2010). Os tipos de enriquecimento ambiental, tipicamente categorizados como enriquecimento social e enriquecimento físico serão descritos a seguir.

3.3.1.1. *Enriquecimento Social:*

Inclui a socialização do animal com ou sem contato, de forma co-específica ou contra-específica, incluindo com humanos (BAUMANS, 2005).

3.3.1.1.1 *Enriquecimento Social Com Contato:*

Espécies sociais devem ser alojadas em grupos ou pares (FIGURA 9). Idealmente, devem ser da mesma ninhada, mas entende-se que isso pode não ser possível por conta do tamanho dos grupos e possível interferência no estudo. De qualquer forma, o grupo deve ser estável e harmonioso, apesar de poderem se fazer necessárias barreiras ou esconderijos para minimizar a agressividade. Mesmo em grupos harmoniosos, deve-se permitir que os animais iniciem ou evitem contato por meio de aproximação ou afastamento. A presença de um parceiro aumenta a atenção e exploração, além de prover diversão, ocupação, e provavelmente sentimentos de "segurança" em grupos estáveis (BAUMANS, 2005).

Figura 9: Camundongos alojados em conjunto



Fonte: EPFL [s.d.]

Respostas de estresse induzidas por procedimentos também são menos frequentes e menos duradouras em animais alojados em grupos em comparação com aqueles em gaiolas solitárias. Ainda, o contato com humanos (manuseio, treinamento e socialização) é benéfico por engajar cognitivamente o animal e permitir interações positivas com os cuidadores, técnicos e cientistas (FIGURA 10) (BAUMANS, 2005).

Figura 10: Pesquisador brincando com rato



Fonte: NC3RS (2020)

3.3.1.1.2. *Enriquecimento Social Sem Contato:*

Inclui comunicação visual, auditiva, e olfativa com sua própria ou outra espécie. Segundo o *Council of Europe*, quando não for possível alojar os animais em grupos deve-se considerar acomodá-los dentro do alcance da visão, audição, ou faro dos outros indivíduos

(FIGURA 11). No entanto, é necessário observar que essa medida pode ser negativa para os animais, se não puderem evitar os estímulos (Council of Europe, 1997).

Figura 11: Par de camundongos separados



Fonte: Ullmann (2020)

3.3.1.2. *Enriquecimento Físico:*

Inclui gaiolas mais complexos e estímulos sensoriais e nutricionais. Além de exercitar suas habilidades de exploração, locomoção e observação, podem praticar habilidades necessárias para a sobrevivência. Por conta disso, brinquedos que estão relacionados a tais habilidades costumam reter mais a atenção dos animais (BAYNE, 2018).

3.3.1.2.1. *Complexidade:*

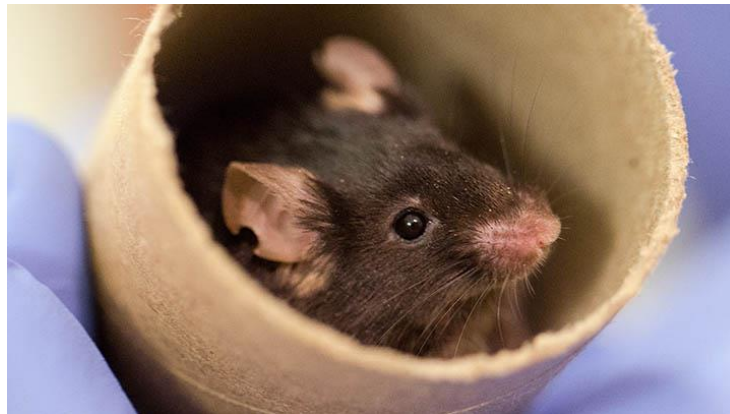
A estruturação apropriada da instalação geralmente é mais benéfica do que uma área maior, porém existe um espaço mínimo que possa fornecer essa estrutura. Exceto para atividades motoras (como brincadeiras), os animais não usam de fato o espaço, mas sim dividem seus ambientes para atividades separadas, como para alimentação, descanso e excreção. Essas divisões permitem que o animal controle seu espaço, incluindo o nível de iluminação, o que pode ser facilitado por estruturas internas da gaiola (como abrigos, caixas para ninho, tubos e plataformas) (FIGURAS 12, 13 E 14) (BAUMANS, 2005).

Figura 12: Plataforma para ratos



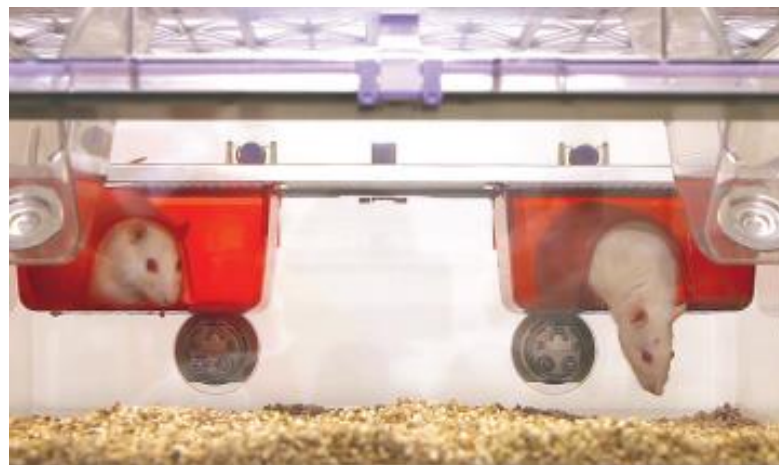
Fonte: NC3RS (2020)

Figura 13: Camundongo em tubo de papelão



Fonte: The University of Manchester[s.d.]

Figura 141: Ratos em abrigos elevados



Fonte: Allentown[s.d.]

3.3.1.2.2. *Ninho:*

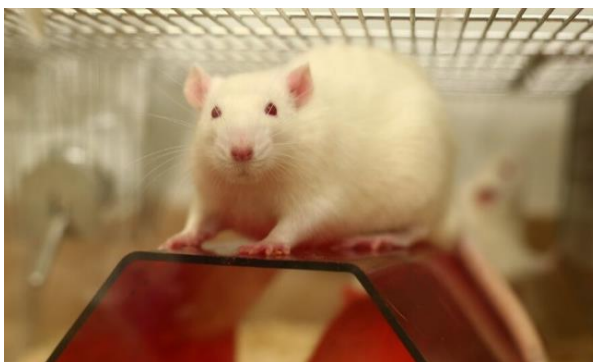
Manipular material para ninho e buscar abrigo oferecem ao animal a oportunidade de expressar esses comportamentos naturais e engajar com o próprio ambiente, além de controlar a própria exposição a luz e regular sua temperatura (FIGURA 15). Os abrigos também podem ser utilizados como uma superfície de descanso elevada, como observado em ratos que dormem dentro dos abrigos durante o período iluminado e em cima deles no período escuro (FIGURAS 16 E 17) (MAKOWSKA, WEARY, 2019).

Figura 15: Camundongo em ninho



Fonte: Charles River Laboratories (2013)

Figura 16: Rato em cima de abrigo



Fonte: Understanding Animal Research (2011)

Figura 17: Rato dentro de abrigo



Fonte: Understanding Animal Research (2011)

A construção de ninhos não é exclusiva para animais em processo de reprodução, tendo sido observado que é uma atividade a que dedicam boa parte de seu tempo, oferecendo a oportunidade de controlarem melhor a própria temperatura, além de aumentar a taxa de sobrevivência dos filhotes. Os materiais podem variar: tiras de papel, algodão, toalhas de papel, raspas de madeira (BAUMANS, 2005).

3.3.1.2.3. *Enriquecimento Sensorial:*

Inclui estímulos visuais, auditivos, olfativos, táteis e de gosto. O enriquecimento mais satisfatório para roedores e coelhos parece ser a comunicação visual, auditiva, olfativa e tátil com outros indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes, seja diretamente ou através de barras (BAUMANS, 2005). Seguem exemplos:

Visual: No estudo de diferentes colorações de dispositivos de enriquecimento, foram percebidas diferenças significativas no ciclo circadiano, metabolismo e fisiologia nos grupos de ratos testados (WREN-DAIL et al., 2016).

Auditivo: Roedores expostos a música tiveram efeitos positivos na química cerebral, além de estatisticamente melhor aprendizado espacial e auditivo, comportamento ansioso reduzido, e resposta imune melhorada, além de mudanças fisiológicas. A maior parte dos estudos teve como foco a música clássica, mas outros tipos de música também tiveram efeitos positivos similares (KÜHLMANN et al., 2018).

Olfativo: Ao limpar as gaiolas dos animais, remover todos os elementos olfativos pode perturbar a hierarquia social, geralmente resultando em picos de agressão. A transferência dos ninhos pode reduzir a agressão, enquanto a transferência da forragem com urina e fezes pode intensificá-la (BAUMANS, 2005).

Gosto: Prover alimentos diferenciados aos animais pode ser um estímulo de gosto, assim como Enriquecimento Alimentar. A ração usual pode ser complementada com itens de diferentes gostos e texturas, como cereais, ervilhas, vegetais e feno, desde que se mantenha o equilíbrio nutricional (FIGURA 18) (DEAN, 1999).

Figura 18: Rato recebendo petisco



Fonte: NC3RS (2020)

3.3.1.2.4. *Enriquecimento Alimentar:*

Os animais tendem a ser altamente motivados para fazer uso do enriquecimento que envolve alimentos, como reportado por diversos estudos, mas as Boas Práticas de Laboratório podem requerer a análise dos materiais utilizados. Dar ao animal a oportunidade de procurar o alimento (como ao espalhar a comida na forragem) aparenta diminuir o tédio, visto que, na natureza, uma boa parte do tempo do animal é dedicada a essa atividade, mesmo que os alimentos estejam contaminados com fezes e urina quando tiverem a oportunidade de encontrá-los (BAUMANS, 2005) Os estudos de Mench (apud BAUMANS, 2015) sugerem que os animais preferem procurar comida mesmo quando essa já está disponível, para adquirirem informações sobre a localização e qualidade de possíveis locais para coleta. Itens adicionais podem satisfazer a necessidade de roer para roedores e coelhos, como feno, palha, gravetos e bolas de madeira, blocos para roer, papelão etc. (FIGURA 19) (ROSS, 2004).

Figura 19: Hamster roendo madeira



Fonte: Animal Welfare Institute (2023)

3.3.2. Validação dos Dispositivos de Enriquecimento Ambiental:

É de suma importância avaliar e validar novas técnicas de enriquecimento ambiental, o que pode ser feito pela análise de diversos aspectos:

- i) uso e preferência por certo tipo de enriquecimento (OLIVEIRA et al., 2018)
- ii) eficiência reprodutiva (MOREIRA,2015)
- iii) efeito no comportamento (como a ausência de comportamento anormal e agressividade)
- iv) parâmetros fisiológicos (como frequência cardíaca, imunologia, e hormônios relacionados ao estresse) (VIEIRA, 2012)
- v) parâmetros bioquímicos (como proteínas totais, HDL, triglicérides, colesterol total, creatinina e ureia) (BISINOTO, 2020).

4. CONCLUSÃO:

Conclui-se que o enriquecimento ambiental é uma responsabilidade ética do pesquisador com os animais de laboratório, assim como com a qualidade da pesquisa. É observado que os animais expostos a ambientes enriquecidos apresentam diversos benefícios fisiológicos, cognitivos, comportamentais, reprodutivos, e até imunológicos quando comparados aos animais em instalações comuns (PIZZUTTO, SGAI, GUIMARÃES, 2009) (GARBIN, FALEIROS, DO LAGO, 2012), e essa diferença afeta diretamente a qualidade dos resultados da pesquisa. Além de ser uma clara aplicação do princípio do refinamento de Russell & Burch (1959), o enriquecimento também pode ajudar na redução do número de animais utilizados e na confiabilidade, visto que esses biomodelos são capazes de responder melhor a estímulos adversos e expressar comportamentos típicos (GARBIN, FALEIROS, DO LAGO, 2012). Portanto, se o ambiente proporcionar as condições adequadas, possivelmente serão modelos mais estáveis, com menor variação entre os indivíduos, reduzindo a necessidade de repetições nos testes realizados. (GARBIN, FALEIROS, DO LAGO, 2012). Apesar de representar um elemento variável para a padronização da criação, pode-se argumentar que os animais em vida livre (e os humanos que serão modelados) vivem em ambientes complexos e estimulantes, aumentando a robustez dos resultados. (BAYNE, 2018). Dessa forma, justificam-se estudos mais profundos para aprimorar a qualidade do enriquecimento oferecido aos biomodelos, além de incentivo à ampliação de sua implementação nas instalações animais.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Antenor. O Bioterismo: evolução e importância. In: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de (org.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006. Cap. 1. p. 19-22.

ASSIS, F. K. de P.; PAULA, J. H. N. de; BERNARDES, L. M. M.; ROSA, R. B.; KLEIN, S. G.; MALTA, S. M.; SILVA, M. V. da. **Bem-estar de animais de laboratório e seu impacto nas pesquisas científicas / Laboratory animal welfare and its impact on scientific research**. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 391–396, 2020. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJAER/article/view/8923>. Acesso em: 4 jun. 2023.

BAEDER, Fernando Martins et al. **Percepção histórica da bioética na pesquisa com animais: possibilidades**. Bioethikos, v.6, n 3, p. 313 - 20, 2012. Disponível em: <http://www.saocamilo-sp.br/pdf/bioethikos/96/7.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2022.

BALLS, Michael. **Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing**. Laboratory animals, v. 28, n. 3, p. 193-211, 1994. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1258/002367794780681714>. Acesso: 19 nov. 2023.

BAUMANS, Vera. **Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research**. ILAR journal, v. 46, n. 2, p. 162-170, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/ilarjournal/article-abstract/46/2/162/910262>. Acesso: 19 nov. 2023.

BAYNE, Kathryn. **Environmental enrichment and mouse models: Current perspectives**. Animal models and experimental medicine, v. 1, n. 2, p. 82-90, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ame2.12015>. Acesso: 19 nov. 2023.

BISINOTO, Larissa Daiane Lima. **Perfil bioquímico de ratos wistar submetidos à exposição contínua em gaiola metabólica associada ao enriquecimento ambiental**. 2020. Disponível em: <https://bdm.ufmt.br/handle/1/1902>. Acesso: 19 nov. 2023.

BOERE, Vanner. **Environmental enrichment for neotropical primates in captivity**. *Ciência Rural*, v. 31, n. 3, p. 543-551, jun. 2001. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782001000300031>. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000300031>. Acesso em: 12 nov. 2022.

BOSZE, Z. S.; HOUDEBINE, L. M. **Application of rabbits in biomedical research: a review**. *World Rabbit Science*, v. 14, n. 1, 2006. Disponível em: <https://riunet.upv.es/handle/10251/9670>. Acesso em: 5 de junho de 2023.

BRASIL, Constituição da República Federativa do Brasil de 1988. Brasília, DF: Senado Federal, 1988.

BROOM, Donald M. **A History of Animal Welfare Science**. *Acta Biotheoretica*, v. 59, n. 2, p. 121-137, 24 fev. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10441-011-9123-3>. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10441-011-9123-3>. Acesso em: 20 out. 2022.

BRYDA, Elizabeth C. **The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research**. *Missouri medicine*, v. 110, n. 3, p. 207, 2013.

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

CLEMONS, Donna J.; SEEMAN, Jennifer L. **The laboratory guinea pig**. Taylor & Francis, 2018.

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Resolução Normativa n.32, de 15 de fevereiro de 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt->

br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-32-de-06-de-setembro-de-2016.pdf. Acesso: 19 nov. 2023.

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Resolução Normativa n.50, de 13 de maio de 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-gm-n-50-de-13-de-maio-de-2021-320652982>. Acesso: 19 nov. 2023.

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Resolução Normativa n.57, de 6 de dezembro de 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-n-57-de-6-de-dezembro-de-2022-448572294>. Acesso: 19 nov. 2023.

Council of Europe. **Resolution on the Accommodation and Care of Laboratory Animals**, Strasbourg, França. 30 de maio de 1997. Disponível em: <https://www.coe.int/en/web/cdcj/1997-res-accommodation-care-lab-animals>. Acesso: 19 nov. 2023.

COUTO, Sebastião Enes Reis. Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao Status Sanitário. In: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de (org.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. Cap. 8. p. 59-64.

COUTO, Sebastião Enes Reis. Criação e Manejo de Cobaias. In: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de (org.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. Cap. 10. p. 71-80.

COUTO, Sebastião Enes Reis. Criação e Manejo de Coelhos. In: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de (org.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. Cap. 12. p. 93-104.

DAMATTA, Renato Augusto. **Modelos animais na pesquisa biomédica**. Scientia Medica, Porto Alegre, v. 20, n. 3, p. 210-211, 2010.

DEAN, S. W. **Environmental enrichment of laboratory animals used in regulatory toxicology studies**. *Laboratory animals*, v. 33, n. 4, p. 309-327, 1999. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1258/002367799780487823>. Acesso: 19 nov. 2023.

DOKE, Sonali K.; DHAWALE, Shashikant C. **Alternatives to animal testing: A review**. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, n. 3, p. 223-229, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319016413001096>. Acesso: 19 nov. 2023.

ERICSSON, Aaron C.; CRIM, Marcus J.; FRANKLIN, Craig L. **A Brief History of Animal Modeling**. *Missouri medicine*, v. 110, n. 3, p. 201, 2013.

FERREIRA, Lydia Masako; HOCHMAN, Bernardo; BARBOSA, Marcus Vinícius Jardim. **Modelos experimentais em pesquisa**. *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 20 (Supl. 2) 2005*. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/acb/a/DcWRbdScdZrY8RXfR7cMM3B/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 4 jun. 2023.

GARBIN, Livia Camargo; FALEIROS, Rafael Resende; DO LAGO, Luiz Alberto. **Enriquecimento ambiental em roedores utilizados para a experimentação animal: revisão de literatura**. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, v. 10, n. 2, p. 153-161, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Rafael-Faleiros/publication/260355552_Enriquecimento_ambiental_em_roedores_utilizados_para_a_experimentacao_animal_revisao_de_literatura/links/0a85e530dcf5e75541000000/Enriquecimento-ambiental-em-roedores-utilizados-para-a-experimentacao-animal-revisao-de-literatura.pdf. Acesso: 19 nov. 2023.

GUILLEN, Javier. **FELASA guidelines and recommendations**. *Journal of the American association for laboratory animal science*, v. 51, n. 3, p. 311-321, 2012. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/jaalas/2012/00000051/00000003/art00006>. Acesso: 19 nov. 2023.

GUIMARÃES, Mariana Vasconcelos; FREIRE, José Ednésio da Cruz; MENEZES, Lea Maria Bezerra de. **Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no brasil**. Revista Bioética, v. 24, n. 2, p. 217-224, ago. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1983-80422016242121>. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-80422016242121>. Acesso em: 20 out. 2022.

HUBRECHT, Robert C.; KIRKWOOD, James (Ed.). **The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals**. John Wiley & Sons, 2010.

KÜHLMANN, AY Rosalie et al. **Music affects rodents: a systematic review of experimental research**. Frontiers in behavioral neuroscience, v. 12, p. 301, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2018.00301/full>. Acesso: 19 nov. 2023.

LAPECHIK, Valderez Bastos Valero; MATTARAIS, Vania Gomes de Moura; KO, Gui Mi. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 169-200

MAGALHÃES, Luiz Edmundo de. **A CIÊNCIA E OS ANIMAIS DE LABORATÓRIO**. RESBCAL, São Paulo, v.1 n.1, p. 7-13, jan./fev./mar. 2012.

MAKOWSKA, I. Joanna; WEARY, Daniel M. **A good life for laboratory rodents?**. ILAR journal, v. 60, n. 3, p. 373-388, 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/ilarjournal/article-abstract/60/3/373/5822548>. Acesso: 19 nov. 2023.

MAPARA, Manjeet; THOMAS, Betsy Sara; BHAT, K. M. **Rabbit as an animal model for experimental research**. Dental research journal, v. 9, n. 1, p. 111, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3283968/> . Acesso em: 5 de junho de 2023.

MELLOR, David J. Updating animal welfare thinking: **Moving beyond the “Five Freedoms” towards “a Life Worth Living”**. Animals, v. 6, n. 3, p. 21, 2016. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/6/3/21>. Acesso: 19 nov. 2023.

MIZIARA, Ivan Dieb; MAGALHÃES, Ana Tereza de Matos; SANTOS, Maruska D'Aparecida; GOMES, Érika Ferreira; OLIVEIRA, Reinaldo Ayer de. **Ética da pesquisa em modelos animais**. Brazilian Journal Of Otorhinolaryngology, v. 78, n. 2, p. 128-131, abr.

2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1808-86942012000200020>. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1808-86942012000200020>. Acesso em: 20 out. 2022.

MOREIRA, Virgínia Barreto. **Eficiência reprodutiva e comportamento parental de camundongos isogênicos e heterogênicos produzidos em ambiente modificado**. 2015. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/126631>. Acesso: 19 nov. 2023.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the care and use of laboratory animals**. THE NATIONAL ACADEMIES PRESS, 2010.

OLIVEIRA, Gabriel; BRÜCK, Miguel; VERONEZ, Thais. **Enriquecimento Ambiental: qual a melhor forma de utilização do Enriquecimento Ambiental para camundongos em biotério?**. 2018. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/56894>. Acesso: 19 nov. 2023.

OLSSON, I. Anna S.; DAHLBORN, Kristina. **Improving housing conditions for laboratory mice: a review of environmental enrichment**. *Laboratory animals*, v. 36, n. 3, p. 243-270, 2002. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1258/002367702320162379>. Acesso: 19 nov. 2023.

PALMER, Clare; SANDØE, Peter. **Animal ethics**. In: APPLEBY, M.C. *et al.* *Animal welfare*. 2. ed. Cabi Publishing, 2011. Cap. 1. p. 1-12.

PIZZUTTO, C. S.; SGAI, M. G. F. G.; GUIMARÃES, M. A. B. V. **O enriquecimento ambiental como ferramenta para melhorar a reprodução e o bem-estar de animais cativos**. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 33, n. 3, p. 129-138, 2009. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/pag129-138.pdf>. Acesso: 19 nov. 2023.

REZENDE, Angélica Heringer de; PELUZIO, Maria do Carmo Gouveia; SABARENSE, Céphora Maria. **Experimentação animal: ética e legislação brasileira**. *Revista de Nutrição*, v.

21, p. 237-242, 2008. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rn/a/8c53nBhytJSW7Zn8PsK5Ptv/?lang=pt>. Acesso: 19 nov. 2023.

ROLLIN, Bernard E.. **The Regulation of Animal Research and the Emergence of Animal Ethics: a conceptual history**. Theoretical Medicine And Bioethics, v. 27, n. 4, p. 285-304, 26 ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1007/s11017-006-9007-8>. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11017-006-9007-8>. Acesso em: 20 out. 2022.

ROSS, B. **Code of practice for the housing and care of laboratory mice, rats, guinea pigs and rabbits**. Victorian Government department of primary industries. Australia, v. 70, 2004. Disponível em: <https://agriculture.vic.gov.au/livestock-and-animals/animal-welfare-victoria/pocta-act-1986/victorian-codes-of-practice-for-animal-welfare/code-of-practice-for-the-housing-and-care-of-laboratory-mice-rats-guinea-pigs-and-rabbits>. Acesso: 19 nov. 2023.

RUSSELL, William; BURCH, Rex. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen & Co., 1959. Disponível em: <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>. Acesso em: 12 out. 2022.

SANTOS, Belmira Ferreira dos. Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao Status Genético. In: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de (org.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. Cap. 9. p. 65-70.

SANTOS, Belmira Ferreira dos. Criação e Manejo de Camundongos. In: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de (org.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. Cap. 14. p. 115-118.

SCHNAIDER, Taylor Brandão; SOUZA, Cláudio de. **Aspectos éticos da experimentação animal**. Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 53, p. 278-285, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rba/a/5w9zzvys9JQ7kzJ6qJWZHdg/>. Acesso: 19 nov. 2023.

SUCKOW, Mark A., HASHWAY, Sara A., PRITCHETT-CORNING, Kathleen R. **The Laboratory Mouse**. third edition. New York: CRC Press, 2022.

TANNENBAUM, Jerrold; BENNETT, B Taylor. **Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose**. Journal Of The American Association For Laboratory Animal Science, v. 54, n. 2, p. 120-132, mar. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25836957/>. Acesso em: 20 out. 2022.

VALENTINE, Helen; DAUGHERITY, Erin K.; SINGH, Bhupinder; MAURER, Kirk J.. The experimental use of Syrian hamsters. In: **The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents**. Academic Press, 2012. p. 875-906.

VIEIRA, Camila Brados Farias. **Bem-estar na experimentação animal**. 2012. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/119440>. Acesso: 19 nov. 2023.

WREN-DAIL, Melissa A. et al. **Effects of colored enrichment devices on circadian metabolism and physiology in male Sprague–Dawley rats**. Comparative medicine, v. 66, n. 5, p. 384-391, 2016. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/cm/2016/00000066/00000005/art00004>. Acesso: 19 nov. 2023.

WÜRBEL, Hanno; GARNER, Joseph P. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. NC3Rs, v. 9, p. 1-9, 2007. Disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Refinementenvironmentalenrichmentandsystematicrandomization.pdf>. Acesso: 19 nov. 2023.

ZURLO, Joanne; RUDACILLE, Deborah; GOLDBERG, Alan M. **The three Rs: the way forward**. Environmental Health Perspectives, v. 104, n. 8, p. 878-880, 1996. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/pdf/10.1289/ehp.96104878>. Acesso: 19 nov. 2023.