

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Curso de Especialização em Biotérios

Camila Fernanda Hernandez

**Bem-estar animal e refinamento ambiental no controle de qualidade
biológico**

São Paulo

2023

Camila Fernanda Hernandez

**Bem-estar animal e refinamento ambiental no controle de qualidade
biológico**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotérios do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotérios.

Orientador (a): Milene Schmidt Do Amaral E Luna

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Hernandes , Camila Fernanda

Bem-estar animal e refinamento ambiental no controle de qualidade biológico /
Camila Fernanda Hernandez ; orientador(a) Milene Schmidt Do Amaral e Luna - São
Paulo, 2023.

36 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Programa de
Pós-Graduação Lato Sensu - Especialização em biotérios.

1. Bem-estar animal 2. Enriquecimentos ambientais. 3. Animais de laborat
Refinamento ambiental I. Luna , Milene Schmidt Do Amaral e. II. Escola Superior do
Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação Lato Sensu - Especialização em
biotérios. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Camila Fernanda Hernandes, aluno(a) do Curso de Especialização em Biotérios, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

Imediato

06 meses

12 meses

Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, de 13 Janeiro de 2023


.....
aluno(a)

De acordo:.....
Orientador(a):

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Milene Luna pelo apoio.

Aos amigos e professores pela agradável convivência.

À Dra. Vânia Mattaraia pela oportunidade e ensinamentos.

A toda equipe do controle de qualidade biológico do Instituto Butantan que me permitiu realizar este trabalho.

" Não há diferença fundamental entre o Homem e os animais nas suas faculdades mentais [...] Os animais, como o Homem, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento."

Charles Darwin

RESUMO

HERNANDES, Camila Fernanda. **Bem-estar animal e refinamento ambiental no controle de qualidade biológico** 2023. 36p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotérios) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Anualmente diversas espécies animais são utilizadas em testes de avaliação e controle de qualidade de produtos biológicos. Atender as exigências dos órgãos regulamentares e a busca pela promoção do bem estar animal fazem parte dos desafios de um laboratório de controle de qualidade. Cada espécie utilizada em testes exige uma necessidade diferente de criação e manejo. Para promover o melhor ambiente e garantir o bem-estar animal faz-se necessário a implementação de um programa de refinamento ambiental bem elaborado, focado no ambiente social, físico, e composto por estímulos sensoriais (auditivos, visuais, olfativos e táteis) e nutricionais. O uso do enriquecimento ambiental favorece que o indivíduo manifeste suas características naturais dentro do laboratório, diminuindo o estresse e promovendo conforto ao animal. Para isso, a implementação do enriquecimento ambiental deve considerar a biologia do animal, o espaço disponível na gaiola e a disponibilidade do material. Este trabalho concentrou-se nas alterações de habitação, manutenção do convívio social e implementação de itens de enriquecimento ambiental que demonstraram afetar positivamente o bem-estar dos animais de laboratório.

Palavras-chave: Bem-estar animal. Enriquecimentos ambientais. Animais de laboratório. Refinamento ambiental.

ABSTRACT

HERNANDES, Camila Fernanda. **Animal welfare and environmental refinement in biological quality control** 2023. 36p. Monograph (Specialization in Vivariums) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Every year several animal species are used in evaluation tests and quality control of biological products. Meeting the requirements of regulatory institutions and the quest to promote animal welfare is part of the challenges faced by quality control laboratories. Each species used in tests needs different raising and management. To promote the best habitat and ensure animal welfare, it is necessary to implement a welfare animals environmental refinement program, focused on the social, and physical environment, composed of sensory (auditory, visual, olfactory, and tactile) and nutritional stimuli. Such measures favor the individual to manifest their natural characteristics within the laboratory, reducing stress and promoting comfort to the animal. Therefore, the implementation of environmental enrichment must consider the biology of the animal, the space available in the cage, and the material availability. This paper is focused on housing changes, maintenance of social interaction, and implementation of environmental enrichment items that have been shown to positively affect the welfare of laboratory animals.

Keywords: Welfare animals. Environmental enrichments. Laboratory animals. Environmental refinement.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3R's: Replacement, Reduction and Refinement (substituição, redução e refinamento)

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

CQB: Controle de Qualidade Biológico

EA(s): Enriquecimento(s) Ambiental (is)

IB: Instituto Butantan

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1	Utilização dos animais em pesquisa e desenvolvimento de produtos	11
1.2	Bem-estar animal e enriquecimento ambiental	12
1.3	O Instituto Butantan	13
1.4	Espécies convencionais de animais laboratório	14
1.4.1	Coelhos.....	14
1.4.2	Cobaias.....	15
1.4.3	Camundongos.....	16
2.	OBJETIVOS	17
2.1	Geral	17
2.2	Específicos	17
3.	METODOLOGIA	18
3.1	Manutenção dos animais no controle de qualidade	18
3.2	Refinamento Ambiental	19
3.2.1	Coelhos.....	19
3.2.2	Cobaias.....	20
3.2.3	Camundongos.....	20
4.	RESULTADOS	22
5.	DISCUSSÃO	29
6.	CONCLUSÕES	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Utilização dos animais em pesquisa e desenvolvimento de produtos

Os animais de laboratório são utilizados há milhares de anos para diversas finalidades ligadas à saúde humana, dentre estas podemos citar a produção e o desenvolvimento de vacinas e de anticorpos monoclonais, a avaliação e o controle de qualidade de produtos biológicos, além de diversas áreas da pesquisa e desenvolvimento de novas terapias e drogas (ANDRADE *et al.*, 2002). A maior vantagem de usar animais em testes de segurança de medicamentos é que eles são modelos representativos de todos os fatores envolvidos na exposição humana (GUITTIN, 2002). e contribuem para o controle de milhares de produtos farmacêuticos que são testados quanto à eficácia, à toxicidade, à potência e à esterilidade e resultam na sobrevivência das pessoas e até de outros animais.

Por muitos anos o uso de animais de laboratório foi realizado de forma não ponderada por parte da sociedade científica, não havia leis que respaldassem o uso consciente dos animais e regras para criação e manutenção adequada de cada espécie, garantindo suas necessidades básicas e bem-estar.

A criação do princípio dos 3R's por Russel e Burch em 1959, deu início a um movimento para aplicação de novas práticas ao uso de animais em laboratório. No Brasil, mudanças significativas com relação à ciência de animais de laboratório surgiram anos depois com a promulgação da Lei Arouca em 2008, que incluiu a criação do CONCEA e das CEUAS (LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008). Como consequência, nos últimos anos, a maneira como os animais de laboratório vem sendo utilizados no ensino e na pesquisa modificou-se radicalmente e é cada vez maior a pressão para que o seu bem-estar e o seu uso justificado estejam assegurados (LAPCHIK, 2017). Diversas resoluções normativas vêm surgindo para adequar as instituições às condições necessárias para a criação, manejo, e utilização adequada das diversas espécies utilizadas em laboratório, priorizando bem-estar animal, promovendo o refinamento, a redução e a substituição através do reconhecimento de métodos alternativos.

Levando-se em conta os princípios dos 3Rs, a consideração do bem-estar animal exige mudanças nas práticas de cuidados com animais em testes de segurança regulamentar. Essas práticas incluem o enriquecimento ambiental, o manejo da dor e do sofrimento dos animais e a melhoria na aplicação dos desfechos

humanitários (GUITTIN, 2002). Nos últimos anos, o bem-estar animal foi estabelecido como um dos critérios utilizados para decidir se um sistema é sustentável e se a qualidade do produto é boa (BROOM, 2016).

1.2 Bem-estar animal e enriquecimento ambiental

A definição de bem-estar animal é o estado do indivíduo em suas tentativas de lidar com o ambiente em que ele está localizado. O bem-estar está relacionado com mecanismos que envolvem a fisiologia, comportamento, sentimentos e resposta patológica (BROOM, 2016).

O enriquecimento ambiental é cada vez mais apreciado como forma de melhorar o bem-estar dos animais, proporcionando-lhes oportunidades para comportamentos específicos da espécie que podem estar disponíveis para eles no ambiente selvagem. Os métodos de “enriquecimento” descritos na literatura podem ser categorizados da seguinte forma: dispositivos (frequentemente referidos a “brinquedos”), agrupamento social, materiais de nidificação e manuseio.

Frequentemente definido como “mudança no meio ambiente”, o enriquecimento pode ser tão complexo quanto a inclusão de brinquedos ou tão simples como o fornecimento de materiais para construção de ninhos. Para que uma mudança seja considerada enriquecedora, ela deve melhorar o bem-estar animal e melhorar o funcionamento biológico dos animais. Uma revisão da literatura mostra que ainda não se chegou a um consenso sobre a definição de mudanças que constituem “enriquecimento ambiental” (SMITH, 2005).

O enriquecimento eficaz muitas vezes requer uma análise detalhada de padrões de comportamento e consequências sobre o objetivo do estudo. Um exemplo de enriquecimento ambiental são os alimentos como o feno para os coelhos, ou o uso de ninhos ou tubos para roedores. O enriquecimento do ambiente dos animais não provavelmente afetará a interpretação dos resultados, como alguns autores têm levantado, principalmente se controles adequados são usados (GUITTIN, 2002).

Antes da implementação de um método de enriquecimento, é importante testá-lo para certificar-se da adequação à espécie, ao alojamento, a facilidade de obtenção dos recursos, e a limpeza. Um bom enriquecimento ambiental deve promover abrigo, proteção, interação, atividade motora, neurológica ou alimentar.

1.3 O Instituto Butantan

Desde 1901, o Instituto Butantan é responsável por grande parte dos soros e vacinas produzidas no Brasil, e é considerado um dos maiores produtores de imunobiológicos voltados para a saúde pública. A epidemia da peste bubônica que atingiu o porto de Santos em 1899 levou o governo federal a designar Vital Brazil, Oswaldo Cruz e Adolpho Lutz, a identificarem o agente etiológico. Após a identificação da doença, as autoridades decidiram implantar laboratórios para produção de vacinas e soros contra o agente, reconhecendo dentre outras instituições, em 1901 sob a denominação de Instituto Serumtherápico, o laboratório do Instituto Bacteriológico situado na fazenda Butantan, criando assim o Instituto Butantan, que teve um papel fundamental não apenas no controle dessas epidemias, mas também, e principalmente, na implantação da pesquisa na área médico-biológica (LAPCHIK, 2017).

O Controle de Qualidade Biológico é uma das áreas responsáveis pela certificação dos produtos produzidos dentro da indústria farmacêutica, fazendo amostragem, especificações e testes que comprovem a eficácia e a segurança de todos os produtos antes da distribuição para a população. (“O Instituto Butantan”, [s.d.]

Para testagem dos produtos produzidos na instituição, algumas espécies de animais são produzidas no Biotério Central do IB, e fornecidas ao CQB de acordo com as especificações de cada teste. Essas espécies são mantidas por um curto período no setor até a finalização dos procedimentos.

O laboratório de controle de qualidade difere de um laboratório de pesquisa convencional ou um biotério de criação, principalmente com relação ao tempo de permanência dos animais. No laboratório de testes de qualidade, o número de animais por teste é muito maior do que o utilizado na pesquisa. Alguns testes podem depender do uso de várias espécies animais para liberação de um único produto. A rotatividade dos animais é alta, e o tempo de permanência no laboratório é curto, sendo para grande parte dos testes em média 03 a 05 dias.

Os testes realizados no controle de qualidade biológico que envolvem animais são: teste de potência de soros e vacinas, teste de dose mínima letal ou necrosante,

teste de inocuidade, teste de pirogênio, tumorigenicidade e teste de agentes adventícios. As espécies utilizadas para estes testes são: camundongos das linhagens Swiss Webster, NIH, Balb/c e Balb/cNude, cobaias Inglesas e coelhos Nova Zelândia branco.

1.4 Espécies convencionais de animais laboratório

As três espécies utilizadas no controle de qualidade são: coelhos, cobaias e camundongos. O tempo de permanência de cada espécie no CQB é variável, sendo para maioria das espécies uma média de 03 a 05 dias, desde a chegada até a eutanásia do animal.

Testes mais longos normalmente duram entre 15 e 28 dias e os mais comuns são os testes de imunização em camundongos. O teste de agentes adventícios é o mais longo para cobaias e dura 6 semanas.

1.4.1 Coelhos

Os coelhos são mamíferos pertencentes à Ordem Lagomorpha, os mais utilizados em experimentação são da raça Nova Zelândia branco (*Oryctolagus cuniculus*), estes animais possuem como características corpo arredondado, cabeça grande com largas orelhas, audição e olfato bem desenvolvidos e amplo campo de visão.

Os coelhos são animais sociáveis que, em vida livre, vivem grande parte do tempo em grupo e em contato próximo uns com os outros. Parte do comportamento do coelho observado no laboratório inclui, realizar posição bipedal, exploração do ambiente, busca por locais altos que permitam ampla visualização, uso de tocas e ninhos para repouso e proteção. (ANDRADE *et al.*, 2002; LAPCHIK *et al.*, 2017).

O manejo do coelho é mais dificultoso em comparação com os roedores, devido ao seu maior tamanho, peso, e fragilidade do seu corpo, que exige experiência do colaborador no momento da contenção.

1.4.2 Cobaias

A cobaia, *Cavia porcellus*, ou também conhecida popularmente como porquinho da Índia, são animais da Ordem Rodentia, a espécie comumente utilizada em biotérios é a inglesa. Estes animais possuem como característica pelagem curta e branca, de olhos vermelhos e orelhas grandes.

A cobaia é conhecida, por muitos, como símbolo representativo dos animais de laboratório. As primeiras utilizações, com fins experimentais, foram realizadas por Lavoisier, em 1790. As cobaias são muito utilizadas em experimentações ligadas à nutrição, farmacologia, imunologia, alergia, radiologia etc. É o animal de eleição para respostas quanto ao sistema complemento, necessário em muitas reações imunológicas. Esses animais são bastante utilizados nos testes de reativos biológicos (COUTO *et al.*, 2002).

As cobaias são animais sociáveis, tímidos e dóceis, assustam-se facilmente, defecam e urinam nos comedouros e derramam sua alimentação pelo piso da gaiola. Vocalizam antes de situações gratificantes como a alimentação ou quando se sentem ameaçadas.

Na natureza as cobaias não se enterram, mas podem viver em tocas feitas por outros animais. Portanto, refúgios como tubos ou abrigos devem ser fornecidos no alojamento em laboratório, para permitir que os animais subam ou se escondam debaixo deles quando assustadas.

Dado que estes animais são sociáveis, devem ser alojados com parceiros, seja em pares, haréns, ou em grupos femininos. Os machos são preferencialmente alojados em pares (FELASA, 2006; KAISER, 2010).

As cobaias não são agressivas entre o grupo, mas animais adultos, frequentemente, mordem as orelhas dos jovens. Para que não ocorram brigas indesejadas ou acasalamentos, os animais selecionados para os testes são mantidos em grupos de mesmo sexo e idade.

As cobaias são extremamente susceptíveis a estímulos estressantes, tais como alterações ambientais, modificações na alimentação, e são muito sensíveis a estímulos intensos como barulho ou movimentos bruscos o que assusta os animais e causa um descontrole no grupo, fazendo com que corram de um lado para outro da gaiola, podendo provocar ferimentos entre eles. Estes estímulos podem ser tão estressantes para o animal que em alguns casos podem levar à morte, portanto é

importante que o manejo ocorra da forma mais calma possível, em local silencioso e por profissionais treinados e experientes (COUTO *et al.*, 2002).

1.4.3 Camundongos

Os camundongos (*mus musculus*) tiveram sua introdução como animal de laboratório há milhares de anos, a escolha deste animal como modelo, muito se deu ao fato do seu pequeno tamanho, prolificidade e período de gestação curto. Estas características foram muito relevantes para a manutenção destes animais no laboratório e fez com que este animal se tornasse o mais utilizado na experimentação animal (DOS SANTOS *et al.*, 2002).

Os camundongos são animais sociáveis, necessitam ser mantidos em grupos e são animais fáceis de manipular e que buscam se esconder durante o contato humano.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Refinar o ambiente para os animais do controle de qualidade biológico buscando a promoção do bem-estar.

2.2 Específicos

- a) Implementar o uso de fontes para o enriquecimento ambiental para cada espécie: camundongos, cobaias e coelhos.
- b) Promover técnicas de refinamento como o convívio social e ampliação do alojamento.

3. METODOLOGIA

3.1 Manutenção dos animais no controle de qualidade

Os animais que chegam ao controle de qualidade para realização dos testes, permanecem em salas individualizadas por espécie. Cada sala possui estrutura de gaiolas abertas, racks ou gabinetes ventilados. Todas as salas possuem sistema de ar-condicionado e a temperatura e umidade são controladas por sistema de exaustão e o registradas através de termo-higrômetros, os registros são realizados diariamente em formulário específico.

As faixas de temperaturas aceitas para sala dos roedores são de 18°C a 24°C e de 16°C a 24°C para os coelhos. A umidade é mantida na média de 60% (RN 55 CONCEA).

Os animais são recebidos diariamente em área isolada das salas de teste. As salas possuem bancadas e balanças, o material (gaiola com maravalha, comedouro e bebedouro) se encontra pronto para fornecimento aos animais na sua entrada no CQB. Além da temperatura e umidade do macroambiente, as racks ventiladas possuem sistema próprio de medição destes parâmetros. Nos gabinetes ventilados, um termo-higrômetro é fixado na parede interna do gabinete para medição. Os animais são separados por sexo, pesados, e a avaliação clínica veterinária é realizada. Caso os animais apresentem alguma alteração ou característica não compatível com a especificação do teste, o animal não é liberado das salas de aclimação e é devolvido ao Biotério central.

Os coelhos são mantidos em gaiolas abertas de 50cm x 50cm x 50cm, preferencialmente em duplas do mesmo sexo, ou individualmente, quando recebidos desta maneira, para evitar brigas. Os coelhos atingem a puberdade entre 150 – 180 dias, com peso entre 3.000 a 3.500 g (ANDRADE *et al.*, 2002). Os animais recebidos para os testes no Controle de Qualidade Biológico, pesam entre 1.500 a 2.500g, portanto, estes comportamentos não são frequentemente observados, e a manutenção em grupo é possibilitada. Cada coelho recebe uma identificação numérica, marcada na parte interna da orelha.

As cobaias assim como os coelhos são recebidas no controle biológico e após a avaliação, pesagem e sexagem, os animais são alocados em caixas com 57cm x 46cm x 22cm em grupos normalmente formados por no máximo 04 animais a depender do peso (RN 55 CONCEA). Animais maiores podem necessitar ficar em

dupla, mas nunca sozinhos, todos do mesmo sexo. As caixas recebem as identificações e são armazenadas em gabinete ventilado.

O camundongo é a espécie recebida em maior número no CQB, após o processo padrão de recebimento, os animais são colocados em gaiolas de 27cm x 16cm x 13cm, forradas com maravalha autoclavada e ficam em racks ventilados, sendo o grupo formado por 5 animais em cada gaiola, todos do mesmo sexo.

Para todas as espécies, o fator determinante para sua utilização nos testes é a faixa de peso, portanto após 24h em aclimatação, os animais são avaliados e pesados novamente. Após a avaliação veterinária e checagem do peso, são liberados para as salas de teste.

3.2 Refinamento Ambiental

3.2.1 Coelhos

Os animais de laboratório, como roedores e lagomorfos, são espécies consideradas presas no ambiente natural. Portanto, eles provavelmente mostrarão fortes respostas ao medo em circunstâncias desconhecidas se não puderem se abrigar, resultando em tentativas de fuga, tentativas de mordidas ou ataque quando manuseados, ou imobilidade repentina para evitar ser detectado. Por esta razão, as gaiolas devem incluir abrigos. (BAUMANS, 2013).

Como estratégia de refinamento do ambiente dos coelhos será ampliado o local de alojamento, a utilização de plataforma acoplada na gaiola, permite que os coelhos possam buscar abrigo abaixo dela quando sentirem-se inseguros, além disso o modelo de gaiola utilizado no CQB, permite união de duas gaiolas através da retirada das divisórias em acrílico. Esta ampliação de espaço permite que os animais possam movimentar-se livremente, permite a inserção de mais dispositivos de enriquecimento, possibilita a exploração de um novo ambiente e a interação com outros indivíduos.

O tubo de papelão mostra-se um enriquecimento muito utilizado nos laboratórios, por ser um item de fácil obtenção e de valor relativamente acessível. O tubo de tamanho comercial para cobaias, disponível no CQB foi fornecido como alternativa de EA para os coelhos.

O fornecimento de folhagem como capim, feno, hortaliça entre outros, é bem-visto, como item de enriquecimento alimentar ou como fonte de alimento para coelhos

(CONCEA, 2019). O feno é uma forma de enriquecimento alimentar que permite que o animal tenha a experiência do consumo da fibra natural, permite o forrageamento, além de promover o desgaste dos dentes. O material foi fornecido de duas maneiras, livre na gaiola, ou dentro de um pequeno tubo de papelão, mesmo material utilizado para os camundongos. O fornecimento do feno dentro do tubo cria um nível de dificuldade para retirada do conteúdo no momento da alimentação, fazendo com que o animal realize atividade motora e sensorial.

3.2.2 Cobaias

A observação da interação das cobaias com o ambiente no laboratório é dificultada devido ao seu próprio comportamento arredio, muitas vezes ao perceber a presença do colaborador os animais paralisam a atividade, ou tentam se esconder abaixo da maravalha ou do comedouro.

A manutenção dos animais em conjunto é essencial para o bem estar dos animais, e o manejo é sempre realizado de maneira calma e silenciosa, evitando que os animais entrem em pânico e vocalizem durante a rotina de testes. Para visualizar a utilização dos itens de enriquecimento ou a interação social é necessário ser extremamente cauteloso e silencioso, evitando movimentos bruscos.

Para fornecer abrigo e conforto para as cobaias, o uso do tubo de papelão foi implementado como enriquecimento ambiental.

Assim como para os coelhos, o feno é um enriquecimento muito aproveitado pelas cobaias, ele é fornecido de forma livre na gaiola, ou dentro do tubo de papelão de camundongos. Quando fornecido de maneira livre, além de servir como alimento, o material fornece abrigo e item de nidificação. Quando fornecido dentro do tubo de papelão, possibilita com que as cobaias exerçam atividade para conseguir retirar o alimento.

3.2.3 Camundongos

Devido ao seu pequeno porte, o que facilita a criação em pequenos espaços e sua ampla utilização em pesquisas, o camundongo é a espécie que possivelmente possui maior quantidade de relatos sobre o uso de enriquecimento ambiental.

Materiais para nidificação, como folhas de papel toalha, algodão, ou tiras de papel de materiais variados, podem ser fornecidos e são geralmente bem aceitos por quase todas as linhagens encontradas em laboratório. Assim como itens para abrigo de diversos materiais: papel, papelão, plástico e acrílico.

A maioria desses enriquecimentos é barata e simples, e permite que o camundongo realize um comportamento específico da espécie, como escavar e entocar-se (HOLLIDA, 2002).

Como materiais para nidificação foi utilizado no CQB algodão e o papel autoclavados. Uma pequena camada de algodão de aproximadamente 5cm foi fornecida no momento da chegada dos animais ou durante a troca da gaiola.

O material para nidificação permite que os animais mantenham a temperatura adequada no microambiente, uma vez que a temperatura da sala e da rack podem oscilar ou não atingir temperaturas de conforto para a espécie.

O papel toalha foi fornecido na quantidade de 5g, dando em média 03 folhas por gaiola.

Para proporcionar diferentes experiências com o mesmo material, foi proposto o fornecimento do material para nidificação de forma suspensa, sob o comedouro da gaiola, criando obstáculo para obtenção do recurso.

Os chamados rolinhos para camundongos constituem em pequenos tubos de papelão que foram fornecidos logo na chegada dos animais na seção, ou durante a troca de gaiolas. O material possibilita além de abrigo, material de nidificação e promove o desgaste dos dentes, quando os animais roem o material para construção dos ninhos. É um item para brincadeiras e refúgio em momentos de interação social.

A máscara facial descartável foi colocada como uma espécie de “rede” para os animais, sendo pendurada nas laterais do comedouro. A utilização da máscara permite ampliação do espaço da gaiola criando um segundo nível acima da cama de maravalha.

4. RESULTADOS

A manutenção dos coelhos em gaiolas abertas de forma conjunta, tem se apresentado benéfica aos animais. Os coelhos apresentam comportamento de interação com seus coespecíficos e brigas são raramente observadas.

Quando observado comportamento de agressão como arrancamento de pêlos, e tentativas de monta ou ataque, os indivíduos são separados imediatamente.

Quando o animal é mantido sozinho, as gaiolas são postas próximas permitindo que um animal possa visualizar o outro através das divisórias transparentes.

O modelo de gaiola utilizado no CQB, permite união de duas gaiolas através da retirada das divisórias em acrílico. Esta ampliação de espaço permite que os animais possam movimentar-se livremente, permite a inserção de mais dispositivos de enriquecimento, possibilita a exploração de um novo ambiente e a interação com outros indivíduos, conforme demonstrado na figura 01.

A gaiola possui ainda, uma plataforma que possibilita ao animal levantar-se, saltar da base para o topo, descansar em ambiente elevado ou abrigar-se abaixo dela, como exemplificado nas figuras 02 e 03.

Figura 1 - Ampliação do espaço através da junção de gaiolas e retirada das divisórias.



Fonte: próprio autor, 2022.

Figura 2 - Animal abrigado embaixo da plataforma. **Figura 3** - Animais descansando em cima da plataforma



Fonte: próprio autor, 2022.

Os coelhos fizeram uso do tubo de papelão de cobaias como item de enriquecimento ambiental, notou-se que os animais menores conseguiram passar por dentro do tubo, e os animais maiores utilizaram de forma lúdica, rolando o tubo pela gaiola, mordendo as laterais, e jogando o tubo de papel para cima com a boca, como observado na figura 04.

Figura 4 - Coelho utilizando tubo de papelão de cobaias.



Fonte: próprio autor, 2022.

O feno é um item de enriquecimento alimentar muito aceito pelos coelhos, após a colocação do material, observa-se imediatamente o interesse dos animais, seja ele fornecido de maneira livre na gaiola, onde os animais descansam sob o feno e ao mesmo tempo se alimentam, figura 05, seja fornecido dentro do tubo de papelão, onde os animais precisam trabalhar para obtenção do alimento, figura 06.

Figura 5 - Feno fornecido de maneira livre na gaiola. **Figura 6** - Animal recebe o feno no tubo de papelão



Fonte: próprio autor, 2023.

Para as cobaias o uso do rolinho de papel demonstrou-se positivo, foi possível observar imediatamente após o fornecimento, os animais adentrarem no tubo procurando abrigo, além de utilizá-lo como item para roer. Frequentemente as cobaias são vistas repousando solitariamente, ou em grupo dentro do material.

Figura 7 - Cobaias utilizando rolinho de papelão como abrigo



Fonte: próprio autor, 2022.

O uso do feno para as cobaias também foi implementado da mesma maneira como para os coelhos, fornecido livremente na gaiola conforme foto 08, ou dentro de tubos de papelão para camundongos. De ambas maneiras a espécie demonstrou interesse pelo alimento sendo consumido em totalidade pelos animais, após algumas horas do fornecimento.

Figura 8 - Fornecimento do feno livre na gaiola.



Fonte: próprio autor, 2022.

O material de nidificação implementado para camundongos, foi aceito e utilizado pelos animais. Os animais constroem tocas, ninhos e túneis, utilizando o material fornecido e a própria cama (maravalha) conforme exemplificado nas figuras 09 e 10.

O algodão possui bom rendimento e uma pequena porção foi suficiente para a elaboração dos ninhos.

O papel possibilitou aos animais realizarem o hábito de roer o material para formar os ninhos, promovendo maior tempo de atividade aos animais.

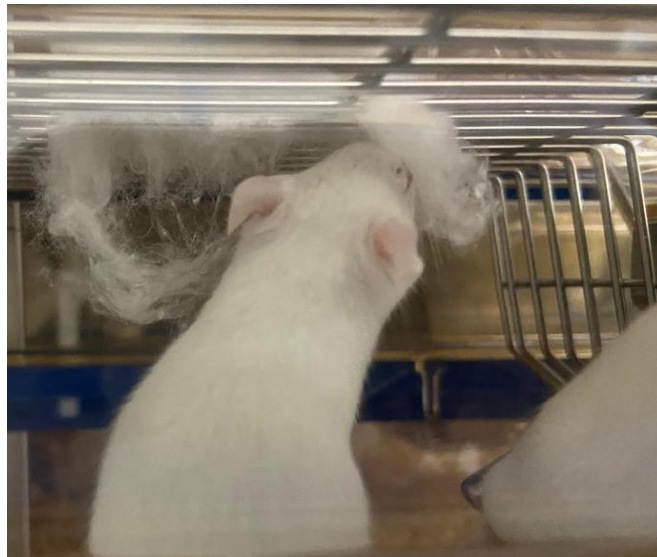
Figura 9 e 10 - Camundongos utilizando algodão, papel toalha e cama de maravalha para construir ninho.



Fonte: próprio autor, 2022.

Fornecer o mesmo material de nidificação de maneira diferente, demonstrou que mesmo com a dificuldade em obter o material necessário para construção dos ninhos, os animais mantiveram o interesse no material, fazendo com que trabalhassem para retirar o algodão pela grade da gaiola, conforme exemplificado na figura 11.

Figura 11 - Camundongo retirando material de nidificação fornecido sob a grade da gaiola.



Fonte: próprio autor, 2022.

O uso dos rolinhos de papel como item de enriquecimento, mostrou-se versátil para os animais, os camundongos usam o rolinho para abrigar-se, e também roeram o material para construir os ninhos, mostrando que o material também pode ser considerado item de nidificação, conforme exemplificado nas figuras 12 e 13.

Figuras 12 e 13 - Utilização do rolinho como material de nidificação e abrigo.



Fonte: próprio autor, 2022.

A máscara, outro item implementado como EA, além de utilizada como “rede” pelos animais, foi observado que os camundongos a utilizaram como material para ninho, desprendendo-a do comedouro e fazendo pequenos buracos onde mantinham-se abrigados. Foi observado que quando fornecida a máscara os animais se mantiveram mais ativos, pulando para dentro e para fora do material pendurado

Figura 13 - Utilização da máscara como enriquecimento ambiental.



Fonte: próprio autor, 2022.

5. DISCUSSÃO

Tendemos a pensar no termo enriquecimento apenas como a adição de material para nidificação ou dispositivos às gaiolas. De fato, o fornecimento de itens de enriquecimento ambiental é muito importante para manter um ambiente estimulador no microambiente do animal, no entanto, mudanças mais sutis, como manter agrupamentos harmônicos podem ser consideradas também uma maneira de enriquecimento como apontado por Smith (2005).

Assim como demonstrado neste trabalho, foi possível verificar que com a ampliação do espaço das gaiolas como no caso dos coelhos, se mostrou um importante refinamento para os animais, uma vez que imediatamente após a retirada das divisórias os animais circularam pelos novos espaços, explorando o ambiente e se mantendo mais ativos durante o dia, demonstrando tempo de ociosidade menor em comparação com o ambiente reduzido a apenas uma gaiola. A junção de duas gaiolas também possibilitou que os animais escolhessem ficar juntos ou mais distantes ao longo do dia (figura 1).

Os testes realizados em produtos biológicos por vezes impõem condições de isolamento temporário dos animais, por exemplo quando ocorre morte dos coespecíficos durante o teste, ou pela incompatibilidade de sexos. Este isolamento apesar de curto pode promover desconforto aos animais. O que pode ser diminuído quando oferecidas possibilidades de enriquecimento ambiental, como materiais que forneçam abrigo, aquecimento e desenvolvimento de atividades cognitivas. Quando ofertado papel toalha e rolinhos de papel, observamos que os camundongos logo se atraem pelo material (figura 11), possibilitando uma melhora na qualidade de vida e redução de estresse desses animais.

Essa segurança pode ser alcançada fornecendo material de nidificação, esconderijos e companheiros de gaiola compatíveis (BAUMANS, 2013).

Van Loo e colegas (2004), abordaram o contato social versus enriquecimento com camundongos. Os animais mostraram preferir permanecer na gaiola com a companhia de outro familiar aos enriquecimentos. Concluiu-se que a habitação individual tem consequências, mas que a presença de material de nidificação pode compensar parcialmente essa privação. Os camundongos, podem passar boa parte de seu tempo destruindo ou organizando o material fornecido para construção do seu ninho, o que reduz o tempo de ociosidade (HOLLIDA, 2002).

O fornecimento de itens de enriquecimento para os animais, como tubos de papelão ou materiais para nidificação, permitem que o animal realize o hábito de roer, construa seu ninho, auxilia a manutenção da temperatura confortável, ajudam os animais a controlar os níveis de luz, e reduz os efeitos dos estímulos estressantes causados pela rotina de testes, como descrito por VAN LOO, 2004 e MANSER, 1998, também relata a utilização imediata da toalha de papel para construção dos ninhos, e a combinação com mais itens também era utilizada pelos animais para elaboração do ninho, fato também observado no CQB, onde os animais utilizaram material de cama e algodão para formação dos ninhos (Figuras 09 e 10) e o rolinho de papelão para roer (Figuras 12 e 13) .

Uma revisão de Olsson e Dahlborn (2002), mostrou que alguns estudos demonstraram que a agressividade entre camundongos pode aumentar com o aumento do espaço e da complexidade da gaiola, e que o fornecimento do material de nidificação sem alteração do alojamento não gerou este efeito.

Van Loo e colegas (2003) demonstraram que a transferência de material de nidificação durante a limpeza da gaiola supostamente reduz a agressividade entre camundongos machos, manejo que deve ser considerado durante a troca de gaiolas destes animais.

Após diversos relatos em literatura observa-se que para camundongos o fornecimento de material para nidificação mostra-se uma medida de enriquecimento benéfica e rentável (Sherwin, 1997).

O material de nidificação de algodão, porém, foi associado à conjuntivite em camundongos nude atímicos (BAZILLE, 2001). E este evento também foi observado no controle de qualidade, quando os camundongos Balb/c Nude receberam o algodão como material de nidificação. Portanto para essas linhagens, apenas o papel deverá ser fornecido, para evitar possíveis intercorrências, e outras alternativas para nidificação deverão ser testadas.

Na natureza, coelhos e roedores gastam boa parte de seu tempo forrageando em busca de alimentos, no ambiente laboratorial fornecer diversidade alimentar como enriquecimento requer cautela e dificuldades, uma vez que a alimentação não deve desbalancear para evitar variabilidades indesejadas. O feno, porém, pode ser um item de fácil aquisição e disponibilização para os animais, e podem satisfazer a necessidade de volumoso e para mastigação em cobaias e coelhos (BROWN, 2009). O feno foi um item implementado e bem recebido pelos animais no controle de

qualidade, conforme podemos observar nas figuras 05 e 06, os coelhos rapidamente se interessam pelo alimento.

Makowska (2020) sugere o uso de “cercados”, que incluem acesso a grandes recintos, estruturados e complexos nas quais coelhos e cobaias são soltos por determinado período de tempo para terem a oportunidade de se exercitar, socializar e expressar parte de seus comportamentos naturais em um ambiente mais rico do que a gaiola. Essa ideia, porém, contrapõe com a estrutura física do laboratório de controle de qualidade. Para simular a ideia do cercado, foi implementada a junção de duas gaiolas para os coelhos, permitindo que os animais obtivessem maior espaço para se exercitarem, socializarem e utilizarem os enriquecimentos ambientais.

Uma simples modificação na forma de fornecer os enriquecimentos, permitiu aos animais novas experiências através do mesmo material fornecido. Como por exemplo a colocação do material de nidificação na parte superior da gaiola, fazendo com que os animais precisem puxá-los para dentro para utilizar o material (SMITH, 2005). Esta experiência foi realizada no controle de qualidade, e como observado na figura 11 os animais mantiveram seu interesse pelo enriquecimento e se esforçaram para usufruir do material para construção de seu ninho, o que pode reforçar ainda mais a importância deste material para os roedores.

Outras formas de fornecimento do feno, como de forma livre na gaiola, ou dentro de tubos de papelão, também permite a variação da utilização dos enriquecimentos, promovendo diferentes experiências aos animais com o mesmo item.

Por ser um laboratório onde os animais são mantidos por curtos períodos quando ocorrem os testes, o laboratório de controle de qualidade torna a aplicação de técnicas de refinamento ambiental desafiadoras, pois não há tempo suficiente para implementar técnicas de manejo mais cooperativo, ou para avaliar criteriosamente a utilização de um enriquecimento ambiental, quando em comparação com estudos de longo prazo, comuns na pesquisa. Mudanças positivas no ambiente podem ser percebidas com a observação da utilização do espaço disponibilizado, ou da modificação realizada na gaiola, e se isso produziu a redução de determinado comportamento não desejado ou do tempo de ociosidade. O uso do enriquecimento fornecido também pode ser percebido imediatamente após a exposição do animal e notou-se que a maioria dos animais demonstrou interesse na utilização do enriquecimento.

Mais estudos devem ser realizados no setor com o objetivo de avaliar preferências e aplicabilidade dos materiais. O efeito da introdução dos enriquecimentos poderá ser notado a longo prazo, com a avaliação dos colaboradores sobre o comportamento dos animais observado durante a utilização dos enriquecimentos. Novas propostas para compra de itens de enriquecimento ambiental disponíveis comercialmente também deverão ser implementadas.

O maior desafio considerado neste estudo, é o refinamento ambiental para cobaias, por ser um animal naturalmente assustado, existem dificuldades em observar seu comportamento em laboratório, além disso, poucas variabilidades de enriquecimento aplicáveis para a espécie e compatíveis com o tamanho padrão das gaiolas foram encontradas.

A socialização entre os animais e os colaboradores é mais uma forma de refinamento ambiental importante para diminuir o estresse dos animais durante a manipulação para os experimentos, porém esta dessensibilização exige um tempo maior de permanência do animal em teste (MAKOWSKA, 2020).

No controle de qualidade os animais são mantidos por tempo muito curto, o que torna este método difícil de ser implementado.

O treinamento periódico dos colaboradores quanto a cautela com a manipulação das gaiolas, o silêncio durante o manejo, no momento da realização dos testes e durante a permanência na sala dos animais, faz parte manejo implementado para os animais no CQB e já diminuem os efeitos negativos nos animais.

6. CONCLUSÕES

O bem-estar animal tornou-se uma preocupação geral na criação e manutenção dos animais de laboratório. E para atender às exigências da sociedade, que tem cada vez mais se mostrado preocupada com a qualidade dos produtos e com a necessária utilização dos animais em laboratório, as instituições devem se adequar aos conceitos do refinamento ambiental e fornecer aos animais condições adequadas para exercerem suas características naturais.

A implementação de um ambiente mais enriquecido no controle de qualidade biológico, mostrou-se benéfica para os animais em teste. Ao avaliar diariamente os animais foi possível observar em todas as espécies que a manutenção dos animais em companhia com outros indivíduos mostrou-se positiva. Uma vez que frequentemente os comportamentos que indicavam harmonia foram observados, como o repouso em grupo, animais compartilhando alimentação, abrigos e ninhos, e interagindo com os itens de enriquecimento ambiental como demonstrado nas figuras expostas neste trabalho.

O enriquecimento ambiental é parte fundamental deste princípio, e pode não ser definido apenas como itens, ou brinquedos para fornecimento aos animais. O termo é mais abrangente e inclui a manutenção de um ambiente enriquecido. Isso significa que mudanças no manejo, utilização de recursos do próprio alojamento, inserção de itens para nidificação, abrigo, possibilidade de interação social com coespecíficos ou colaboradores, ou até mesmo fornecer o material já utilizado de maneira diversificada, são considerados parte do enriquecimento ambiental. É possível portanto melhorar o ambiente para os animais, com mínimas mudanças que promovam o bem-estar, e permitam ao animal expressar seu comportamento de forma mais natural possível.

REFERÊNCIAS¹

ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS. (Orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/sfwtj> . Acesso em: 11 out. 2022.

BAUMANS, V. ; VAN LOO, P.L.P. How to improve housing conditions of laboratory animals: The possibilities of environmental refinement. **The Veterinary Journal**. Jan. 2013, v 195, n. 1, p. 24-32. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.09.023> . Acesso em: 10 out. 2022.

BAZILLE , P G ; WALDEN, S D ; KONIAR, B L ; GUNTHER, R . Commercial Cotton Nesting Material as a Predisposing Factor for Conjunctivitis in Athymic Nude Mice. June 2001 **Laboratory Animal**, Jun 2001 v.30 n. 5, p. :40-42. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11385733> . Acesso em: 14 out. 2022.

BROOM, D. M. (2016). Animal welfare: concepts, study methods and indicators. **Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias**, 2016, v. 24, n. 3, p. 306–321. Disponível em: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/324688>. Acesso em: 10 out. 2022.

BROWN , Cyndi . Novel food items as environmental enrichment for rodents and rabbits. **Lab Anim (NY)**. Apr. 2009, v. 38, n. 4, p.119-20. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/labam0409-119> . Acesso em: 10 out. 2022.

CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**: fascículo 2: roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Brasília, BR: Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal., 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/paginas/publicacoes-legislacao-e-guia/publicacoes-do-concea> . Acesso em: 01 nov. 2022.

CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 55, De 5 de outubro de 2022. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. **Resolução Normativa n.55, de 5 de outubro de 2022**, Brasília 5 out de 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-n-55-de-5-de-outubro-de-2022-434869177>. Acesso em: 13 jan. 2023.

FELASA - **Federation of European Laboratory Animal Science Associations. Guidelines for accommodation and care of animals**. Appendix a of the european Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and Other

¹ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

scientific purposes. n. 123, 2006. Disponível em: <https://rm.coe.int/168007a445>. Acesso em: 28 out. 2022.

GUITTIN, Pierre ; DECELLE, Thierry . Future Improvements and Implementation of Animal Care Practices Within the Animal Testing Regulatory Environment. **ILAR Journal**, 2002, v. 43, n. 1, p. 80–84. Disponível em: https://doi.org/10.1093/ilar.43.Suppl_1.S80 . Acesso em: 23 out. 2022.

HOLLIDA, Denise Fillman ; LAND, Margaret S. Animal Care Best Practices for Regulatory Testing. **ILAR Journal**, 2002, v. 43, n.1, p. 49–58. Disponível em: https://doi.org/10.1093/ilar.43.Suppl_1.S49 . Acesso em: 12 out. 2022.

KAISER, Sylvia ; KRÜGER, Christine; SACHSER, Norbert. **The Guinea Pig: The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals**. Oxford, UK: The Universities Federation for Animal Welfare, 2010. 8. ed. p. 380–398 .

LAPCHIK, Valderes Bastos Valero ; MATTARAIA, Vania Gomes De Moura ; KO , Gui Mi . **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. 2. ed. Rio de Janeiro, 2017, Editora: ATHENEU,.

Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. 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. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm>. Acesso em: 20 out. 2022.

MAKOWSKA, I Joanna ; WEARY , Daniel M . A Good Life for Laboratory Rodents?. **ILAR Journal**, 2020, v. 60, n. 3, 2019, p. 373–388. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ilar/ilaa001> . Acesso em: 26 out. 2022.

MANSER, C. E. ; BROOM, D. M. ; OVEREND, P. ; MORRIS, T. H. . Operant studies to determine the strength of preference in laboratory rats for nest-boxes and nesting materials. **Laboratory Animals**. 1998, v. 32, n. 1. Disponível em: <https://doi.org/10.1258/002367798780559473> . Acesso em: 22 out. 2022.

O INSTITUTO. Instituto Butantan. São Paulo. Institucional. Disponível em: <https://butantan.gov.br/institucional/o-instituto> . Acesso em: 11 out. 2022

OLSSON, I Anna S ; DAHLBORN, Kristina . Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment. **Laboratory Animals**, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1258/002367702320162379> . Acesso em: 26 out. 2022.

RUSSELL, W.m.s; BURCH, R.I. **The Principles of Humane Experimental Technique**. Johns Hopkins, 1959. Disponível em: <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique> Acesso em: 13 out. 2022.

SHERWIN, C.m ; NICOL, C.j . Behavioural demand functions of caged laboratory mice for additional space. **Animal Behaviour**, January 1997, v.53, n. 1, p. 67-74. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/anbe.1996.0278>. Acesso em: 14 out. 2022.

SMITH, Abigail L. ; CORROW, Dorcas J. . Modifications to Husbandry and Housing Conditions of Laboratory Rodents for Improved Well-being. **ILAR Journal**, 2005, v.46, n. 2, p.140–147. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ilar.46.2.140>. Acesso em: 23 out. 2022.

VAN DE WEERD, Heleen A ; AARSEN, Emma L ; MULDER, Anne; KRUITWAGEN, Cas L J J ; HENDRIKSEN, Coenraad F M; BAUMANS, Vera . Effects of environmental enrichment for mice: variation in experimental results-boxes and nesting materials. **Journal of Applied Animal Welfare Science** 2002, v. 5, p. 87–109. Disponível em: https://doi.org/10.1207/S15327604JAWS0502_01 . Acesso em: 25 out. 2022.

VAN LOO, P. L. P. ; VAN DE WEERD, H. A.; VAN ZUTPHEN, L. F. M.; BAUMANS, V.. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. **Laboratory Animals**, 2004. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1258/002367704322968867> . Acesso em: 17 out. 2022.