

Avaliação do bem-estar animal quanto ao nível de amônia no microambiente para camundongos Swiss Webster em biotério

Assessment of animal welfare based on the level of ammonia in the microenvironment of Swiss Webster mice in a house facility

Miguel Ângelo Brück
Gonçalves^{1,*} 

Valdeci de Souza Pessanha^{II} 

Gabriel Melo de Oliveira^{III} 

Octavio Augusto França
Presgrave^{III} 

RESUMO

Introdução: O camundongo (*Mus musculus*) é uma das espécies mais utilizadas para fins didáticos e científicos, devido a características que o tornam adequado ao uso nas pesquisas científicas: tamanho corporal, facilidade de manuseio, prolificidade, ciclo de vida curto, além da similaridade biológica e genética, que o aproxima do ser humano em 70 a 90%. Além disso, tem o olfato acurado, pois seu bulbo olfatório é proporcionalmente grande quando comparado com o encéfalo. **Objetivo:** Avaliar a eficiência da relação entre a periodicidade de “troca de gaiolas” e o piso/cama de maravalha ou flocos de *pinus* utilizado, para determinar a qualidade do microambiente e seu impacto direto no bem-estar de camundongos mantidos em um biotério de experimentação de *status* sanitário convencional. **Método:** Este artigo avaliou a qualidade do ar no microambiente dos camundongos por meio do nível da concentração de amônia, a eficiência de absorção de amônia pelos pisos/camas na “troca de gaiolas” e o teste de espécies reativas de oxigênio (ERO). **Resultados:** Microambientes com quatro indivíduos machos adultos atingem concentrações elevadas de amônia, ainda que inferior a 25 ppm (valor padrão), em ambos os tipos de piso/cama. A troca das gaiolas uma vez por semana mostrou-se imprópria para a manutenção dos indivíduos, já na 5ª semana de vida. Infere-se que a frequência de troca duas vezes por semana não induz ao desconforto ou estresse em biotério sobre o piso/cama de maravalha. **Conclusões:** Os valores de concentração de amônia são influenciados diretamente pelo tipo de piso/cama e a frequência de “troca de gaiolas”.

PALAVRAS-CHAVE: Camundongos; Microambiente; Experimentação Animal; Amônia; Bem-Estar Animal

ABSTRACT

Introduction: Mice (*Mus musculus*) are one of the most used species for teaching and scientific purposes, which has characteristics that make it suitable for use in scientific research: body size, ease of handling, prolificacy, short life cycle, in addition to similarity biological and genetic, which brings it 70% to 90% closer to humans, in addition to having an accurate sense of smell, as its olfactory bulb is proportionally large when compared to the brain. **Objective:** To evaluate the efficiency of the relationship between the periodicity of “cage exchange” and the wood shavings or pine flakes floor/bedding used, and to determine the quality of the microenvironment and its direct impact on the animal welfare of mice kept in an experimental house facility of conventional sanitary status. **Method:** This article evaluated the air quality in the microenvironment of mice through the level of ammonia concentration, the Ammonia Absorption Efficiency by Floors/Beds when changing boxes and the Reactive Oxygen Species Test (ROS). **Results:** They indicated that microenvironments with four adult male or female individuals reach high concentrations of ammonia, although lower than 25 ppm (standard value), in both types of floor/bed, as well as changing the boxes once /week, it was unsuitable for the maintenance of

^I Centro de Experimentação Animal, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Laboratório de Biologia Celular, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{III} Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: miguel.goncalves@ioc.fiocruz.br

Recebido: 09 jun 2024

Aprovado: 23 set 2025

Como citar: Gonçalves MAB, Pessanha VS, Oliveira GM, Presgrave OAF. Avaliação do bem-estar animal quanto ao nível de amônia no microambiente para camundongos Swiss Webster em biotério. Vigil Sanit Debate, Rio de Janeiro, 2025, v.13: e02356. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.02356>



individuals, already in the 5th week of life, which can infer that the frequency of changing twice/week does not induce discomfort or stress in the house facilities on the Maravalha floor/bed. **Conclusions:** Ammonia concentration values are directly influenced by the type of floor/bed and the frequency of cage exchange.

KEYWORDS: Mice; Microenvironment; Animal Experimentation; Ammonia; Animal Welfare

INTRODUÇÃO

A Ciência de Animais de Laboratório (CAL) é uma área do saber que se desenvolve em busca de respostas sobre ética, bem-estar animal e inovação de técnicas e procedimentos na área da saúde pública. No que tange ao desenvolvimento científico e tecnológico, no Brasil, tem desenvolvido uma importante plataforma de sustentação às pesquisas biomédicas por meio da experimentação animal^{1,2}.

Nessa área regulamentada, preconiza-se a utilização dos animais para fins didáticos e pesquisa tecnológica e científica. O desenvolvimento de modelos experimentais deve ser relevado o conhecimento em relação ao bem-estar do animal, o que consequentemente eleva a qualidade da reprodutibilidade e confiabilidade de resultados no uso de animais em diversas abordagens como o controle da qualidade de fármacos e vacinas assim como na vigilância sanitária^{1,2}.

Em 2008, a atividade de uso de animais em ensino e pesquisa científica ganhou um marco legal significativo no Brasil. A Lei nº 11.794³, conhecida como Lei Arouca, sancionada em 8 de outubro daquele ano, estabeleceu diretrizes específicas para a regulamentação desta prática em todo o território nacional. Posteriormente, o Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009⁴, veio a regulamentar a Lei, delineando as normas para a criação e a utilização responsável de animais em atividades relacionadas ao ensino e à pesquisa científica, enfatizando a necessidade de práticas éticas e o bem-estar animal. Por meio desta Lei, foi criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), que formulou o guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, descrevendo que a atividade de transferência dos animais de uma gaiola onde estavam (suja) para nova (limpa) é chamada de “troca de gaiolas”⁵.

Diante da necessidade do uso de animais de laboratório na pesquisa biomédica, Bravin et al.⁶ e Silva et al.⁷ citam que os animais de laboratório, como o camundongo da linhagem Swiss Webster (SW), são imprescindíveis também em áreas que ainda não podem ser substituídos em sua totalidade, principalmente para fins tecnológicos e científicos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determina, na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 136, de 23 de maio de 2003, a obrigatoriedade de relatórios deste tipo de ensaio para o registro de novos medicamentos, bem como na fase de processos regulatórios e de controle da qualidade em ação de vigilância sanitária de produtos biológicos⁸.

A origem deste animal como modelo experimental se deve à captura de subespécies selvagens, principalmente a *Mus musculus domesticus*, o *Mus musculus musculus*, o *Mus musculus castaneus*

e a subespécie híbrida *Mus musculus molossinus*. Durante séculos, muitos criadores em diversas localizações geográficas criaram e trocaram indivíduos selecionados dentre eles. Houve, a partir de então, a promoção de uma variabilidade genética expressiva e a dificuldade em registrar com precisão subespécies que deram origem às linhagens isogênicas e colônias não isogênicas⁹.

Os camundongos apresentam hábitos noturnos, acomodando-se em qualquer local de tamanho apropriado às suas necessidades. Manifestam a maioria dos seus comportamentos reprodutivos e sociais no escuro e também comportamentos característicos da espécie muito expressivos, como a confecção de ninho e o alojamento em tocas^{10,11,12,13}.

Em ambientes com padronização dos fatores ambientais e restrição de espaço, pela descrição do Guia/Concea, a frequência da troca é uma consequência da estrutura física da instalação onde estão mantidos os animais, da quantidade e *status* sanitário onde ocorra, como em gaiolas abertas com uma boa renovação de ar (10 a 20 trocas de ar por h). Já em sistemas de acasalamentos poligâmicos podem ser realizadas duas trocas por semana. Em microisoladores com animais em acasalamentos monogâmicos e bom material de cama, a frequência pode chegar a cada 10 a 14 dias sem troca⁵. Ainda, segundo o Guia/Concea, a frequência de “troca de gaiolas” depende da capacidade do sistema de trocas de ar de cada equipamento, mas o objetivo é um só: diminuir o teor de amônia dentro das gaiolas dos animais e a manutenção do bem-estar⁵.

Gamble e Clough¹⁴ salientaram que altas concentrações de amônia podem comprometer de forma contínua o trato respiratório, aumentando a suscetibilidade aos agentes infecciosos, alergênicos e cancerígenos. Contudo, eles não especificaram qual linhagem de camundongos foi utilizada em sua pesquisa, o que limita a aplicabilidade de seus achados a um contexto mais amplo.

O metabolismo renal da amônia desempenha um papel importante na manutenção da homeostase ácido-base. A excreção renal de amônia é o componente predominante da excreção líquida basal de ácido, e o aumento da excreção de amônia é o componente predominante do aumento da excreção líquida de ácido em resposta a uma variedade de distúrbios, como acidose metabólica e hipocalemia¹⁵.

O objetivo deste artigo foi avaliar a eficiência da relação entre a periodicidade de “troca de gaiolas” e o piso/cama de maravalha (MA) ou flocos de *pinus* (FP) para determinar a qualidade do microambiente relacionado ao nível de amônia e seu impacto direto no bem-estar de camundongos da linhagem SW, mantidos



em um biotério de experimentação de *status* sanitário convencional. O estudo busca o refinamento da atividade de manutenção destes animais e proporcionar um incremento na confiabilidade de ensaios em diversas áreas, como o controle da qualidade de fármacos, vacinas e testes diagnósticos na vigilância sanitária.

MÉTODO

Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus mus musculus*), SW, machos, provenientes do biotério de criação da Universidade Federal do Rio de Janeiro, na idade de infantes, quatro semanas de vida (sdv), sendo quatro animais/gaiola, para formação de quatro grupos divididos por faixa-etária para cada ensaio. Após o recebimento, os animais tiveram uma semana de aclimação e receberam o enriquecimento ambiental denominado trapézio e cada grupo com seu respectivo tipo de piso/cama, FP ou MA. A avaliação da “troca de gaiolas” era feita com frequência de uma vez por semana (4ª feira) e duas vezes por semana (2ª e 5ª feira). Os camundongos foram mantidos em estantes ventiladas de duas portas (marca ALESCO®, São Paulo) sob condições de temperatura ($23\pm3^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($55\pm10\%$), fotoperíodo (ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro), e trocas de ar (15 a 20 por h), controlados. A alimentação era constituída por água em bebedouros do tipo mamadeira de polipropileno autoclavável, com rolhas de borracha nitrílica com furo vulcanizado e bico em aço inoxidável e ração para a espécie camundongo (marca Nuvilab®, Paraná), em dieta *ad libitum*. Todos os procedimentos descritos nesse trabalho estão em conformidade com os princípios éticos, da legislação nacional vigente e devidamente aprovados pela Licença CEUA/IOC: L - 009/2022-A1.

Concentração de amônia

A determinação da concentração de amônia nas gaiolas com seus respectivos tipos de pisos/camas foi realizada na 4ª feira, quando o protocolo foi de uma troca do substrato uma vez por semana, e 2ª e 5ª feira, quando o protocolo de troca de substrato foi de duas vezes por semana. Essa determinação foi realizada por meio de um equipamento detector *Smart Sensor* Amônia, (marca AR 8500®, China), com alarme sonoro e luminoso, com temperatura de operação na faixa entre -10°C a 50°C , faixa de medição de NH_3 de 0-100 ppm, com nível de precisão de 2%, conforme as orientações do fabricante. O equipamento foi instalado na gaiola, manualmente (com o sensor numa altura de 10 cm do piso). Após a retirada dos animais, ele foi posicionado no local determinado como área de higiene. Quando o *display* estabilizava o valor em tela, considerava-se esse como valor final para o lançamento na planilha e a coleta dos dados.

Para a mensuração da eficiência de absorção de amônia (EabsA), pelos diferentes tipos de pisos/camas, utilizou-se o cálculo descrito por Ferrecchia et al.¹⁶, em 2014, em que a MA possui um coeficiente de absorção de $P = 0,182 \pm 0,001$ e o coeficiente de absorção do FP é de $P = 0,056 \pm 0,001$. O uso dos respectivos valores foi devido ao cálculo prévio de Burn e Mason¹⁷. Ao final,

optou-se pela equação: $\text{EabsA} = \text{Volume de urina} \times \text{Coeficiente de absorção por piso (P)} / \text{Valor da concentração de amônia para cada sdv dos camundongos}$.

Avaliação neurológica

Para a determinação da liberação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) no cérebro foi realizada a imunofluorescência, utilizando o tecido do córtex frontal que foi seccionado em criostato (marca Leica Biosystems, Wetzlar®, Alemanha) com 5 μm de espessura. Em seguida, realizou-se a lavagem das lâminas por três vezes em PBS e fixação a temperatura ambiente por 20 min em solução de paraformaldeído a 4%. As amostras foram permeabilizadas e bloqueadas por 1 h em câmara úmida, sob agitação a 4°C , em solução de bloqueio PBS contendo de 0,5% Triton X-100 (marca Sigma-Aldrich®, Alemanha), 0,1% Tween 80 (marca AMRESCO®, EUA), 2% de albumina sérica bovina (BSA, marca Sigma-Aldrich®, Alemanha), 5% SFB, 10% soro de carneiro. Em seguida, houve lavagem em tampão contendo as mesmas concentrações de Tween 80 e Triton X-100. Para a avaliação da presença de espécies reativas de oxigênio, o tecido foi posteriormente incubado por uma h com anticorpo primário contra ERO obtido em coelho (marca Sigma-Aldrich®, Alemanha) em câmara úmida *overnight*, seguido de lavagens com tampão de bloqueio. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 1 h com anticorpo secundário contra coelho produzido em cabra, acoplado ao fluorocromo Alexa Fluor 488 (marca Invitrogen®, EUA).

Análise estatística

A coleta dos dados e o processamento estatístico dos resultados foram realizados através dos programas *Excel* e *GraphPad Prism* para realização das operações matemáticas de soma, média, percentual e o desvio-padrão ($\pm\text{DP}$) de todos os dados obtidos. Definiu-se como fator de significância ($p \leq 0,05$) sob o teste estatístico *t student*. Esses resultados foram confirmados através da aplicação do teste estatístico não paramétrico Mann Whitney com o mesmo valor de significância. No indicador de EabsA, foi utilizado o Teste Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

Concentração de amônia

Os resultados foram descritos nas avaliações quanto à mensuração na concentração de amônia em razão do número de trocas. Na frequência de troca de duas vezes por semana, comparado entre MA e FP, de animais infantes (4ª sdv), jovens (5ª a 8ª sdv) e adultos (acima da 8ª sdv) (Figura 1), foi observado que na 4ª sdv não houve elevação dos níveis de concentração de amônia (MA: 0 ± 0 ; FP: 0 ± 0 ppm). Na 5ª sdv, os valores ainda permaneceram relativamente baixos (MA: $8,0\pm1,0$; FP: $2,0\pm0,1$ ppm) entre as mensurações nos dias determinados (2ª e 5ª feira). Entretanto, entre a 6ª e a 7ª sdv, os animais que receberam a MA apresentaram uma elevação significativa da concentração de amônia no interior da gaiola, que, no segundo dia de mensuração da 6ª sdv, atingiu valores de $19,0\pm1,0$ e $17,0\pm1,9$ ppm, respectivamente. Enquanto isso, o piso/

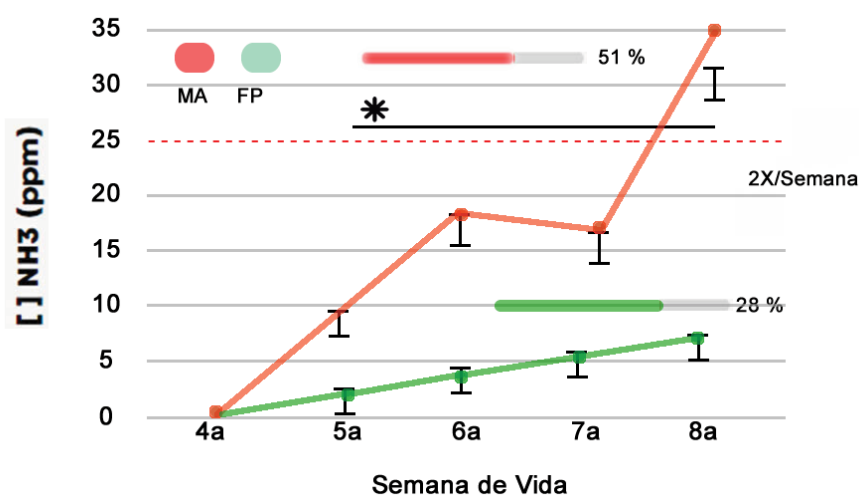


cama de FP apresentou pequena elevação na sua concentração de amônia (6ª sdv: $2,0 \pm 0,1$; 7ª sdv: $2,5 \pm 0,5$ ppm). Por fim, uma elevação significativa foi observada no nível de amônia entre a 7ª e 8ª sdv, nos camundongos que utilizavam MA ($35,0 \pm 2,5$ ppm) no segundo dia de mensuração da 8ª sdv, uma elevação condizente a 51% da concentração do nível de amônia em relação à mensuração anterior. No entanto, nos animais mantidos em FP ($6,9 \pm 1,6$ ppm), observou-se que, entre a 5ª e 8ª sdv, ocorreu uma elevação de 28% em relação à mensuração anterior e a concentração da amônia abaixo do valor limite de 25 ppm, conferindo qualidade ao microambiente quanto a concentração de amônia.

Ao analisar os tipos de cama MA e FP na frequência de troca de uma vez por semana (Figura 2), foi observado que na 4ª sdv os resultados são de $0,0 \pm 0,0$ ppm para ambos os materiais. De forma similar ao manejo anterior, já na 5ª sdv demonstram acúmulo de amônia (MA: $11,0 \pm 4,5$; FP: $11,0 \pm 1,0$ ppm).

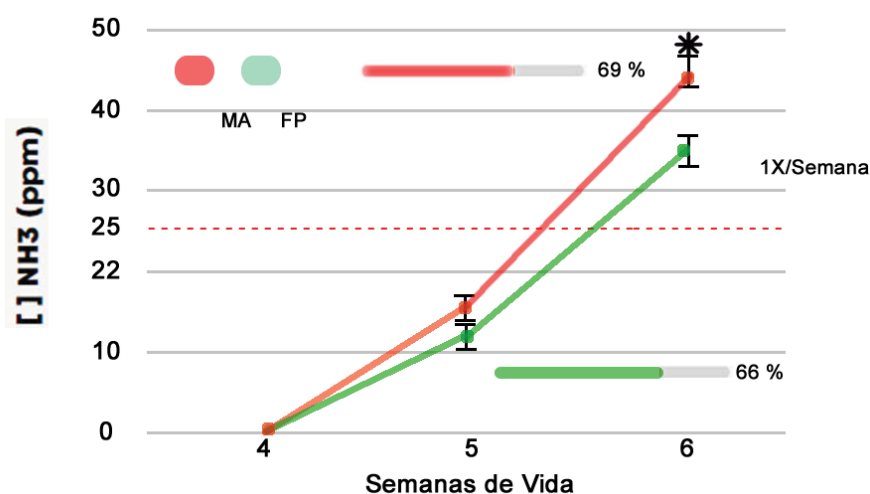
Eficiência de absorção de amônia - maravalha

Com o cálculo de EAbsA, observou-se o comportamento de eficiência da MA e FP em relação à estimativa de absorção de amônia e às diferentes frequências de troca de piso/cama.



* Demonstra a significância estatística ($p \leq 0,05$) entre a MA e o FP no respectivo período.

Figura 1. Concentração de amônia, indicado em forma de [] NH_3 , para Swiss Webster macho com troca duas vezes por semana: O valor médio da concentração de NH_3 (ppm) no interior das gaiolas de camundongos com a frequência de substituição do piso/cama em duas vezes por semana, onde a linha avermelhada está relacionada aos valores para maravalha (MA) e a verde (FP) ao floco de *pinus*. Estatisticamente, a diferença percentual ocorreu entre a 5ª e a 8ª sdv.



* Demonstra a significância estatística ($p \leq 0,05$) entre a MA e o FP no respectivo período.

Figura 2. Concentração de amônia, indicado em forma de [] NH_3 , para Swiss Webster macho com uma troca por semana: O valor médio da concentração de NH_3 (ppm) no interior das gaiolas de camundongos com a frequência de substituição do piso/cama em uma vez por semana, onde a linha avermelhada está relacionada aos valores para maravalha (MA) e a verde (FP) ao floco de *pinus*. Estatisticamente, a diferença percentual ocorreu entre a 5ª e a 6ª sdv.



No manejo de troca de duas vezes por semana (Figura 3), com *Swiss Webster* macho (SWM), houve perda de eficiência que ocorreu próximo ao início 6ª sdv, o que foi denominado como “Ponto Limite”. Foi estabelecido, após mensurar semanalmente, o acúmulo no volume de urina (ml) (6ª sdv: $36,6 \pm 10,4$ ml) e a concentração de amônia (6ª sdv: $21,0 \pm 5,0$ ppm) sendo calculado pelo Fator de Absorção da MA (1,6). Então, determinou-se que a EAbsA apresenta seu nível ótimo na 5ª sdv (22,0), diminui significativamente para 15,0 na 6ª sdv e praticamente perde a sua função no 6ª sdv (12,0). Observou-se uma elevação de aproximadamente 70% dos níveis de amônia na 8ª sdv em relação à mensuração anterior.

Na mensuração da EAbsA do piso/cama no regime de uma troca por semana, foi observado que na terceira semana o volume de urina de camundongos SWM foi de $10,0 \pm 0,5$ ml sendo a concentração de amônia de 0,0 ppm.

Na 4ª sdv, o volume de urina elevou-se para $15,0 \pm 0,5$ ml, correspondendo a uma concentração de amônia de 15 ppm e um índice de absorção da MA em uma troca semanal de valor 8,0, sendo esta a sua capacidade máxima. Na 5ª sdv o volume de urina eleva-se para $50 \pm 4,5$ ml, diretamente proporcional a elevação da concentração de amônia que indicou índice acima de 25 ppm e a capacidade de absorção em queda para o índice de valor 3,0.

Eficiência de absorção de amônia - flocos de *pinus*

Na realização do cálculo de EAbsA, observou-se o comportamento de eficiência do FP em relação à estimativa de absorção de amônia e as diferentes frequências de troca de piso/cama. As mensurações foram realizadas por grupo e os valores são as médias, em razão das variáveis consideradas no trabalho. Em relação à eficiência do FP e sua estimativa de absorção de amônia na periodicidade de duas vezes por semana foi observado que o volume de urina, os valores de concentração de amônia e os fatores de absorção demonstraram que o uso do FP como piso/cama, com

frequência de troca de duas vezes por semana (Figura 4) não interferiu na EAbsA. Apesar dos períodos críticos, a partir da 5ª sdv (Volume de urina: $32,0 \pm 11,5$ ml), a concentração de amônia manteve-se em: $2,0 \pm 0,1$ ppm. Assim como na 6ª sdv: (Volume de urina: $39,0 \pm 21,0$ ml) e concentração de amônia $2,5 \pm 0,5$ ppm.

O volume de urina para cada idade e a concentração de amônia no microambiente determinam o fator de absorção do FP em razão do número de trocas. O FP apresenta curva de eficiência de absorção da amônia abaixo de 25 ppm até a 8ª sdv.

Em relação à eficiência do FP em relação à estimativa de absorção de amônia uma vez por semana, demonstrou uma característica semelhante ao da MA. Na 4ª sdv, o volume de urina foi de $17,8 \pm 7,9$ ml para o total de quatro camundongos SWM, enquanto a concentração de amônia possuía valor zero, sendo diretamente proporcional ao índice de absorção de amônia pelo piso/cama FP. O ponto limite e a perda da capacidade de absorção do piso/cama das concentrações de amônia ocorrem na 4ª sdv, quando o volume de urina total é de $35,5 \pm 3,7$ ml, mantendo-se a concentração de amônia foi de 10 ppm e um índice de absorção de amônia com índice 12,0. Na 5ª sdv, com a perda da capacidade de absorção de amônia, manteve-se o índice de 12,0, contudo, com um volume de urina elevando-se para $51,7 \pm 4,6$ ml e uma concentração atingindo níveis máximos de 39 ppm.

Teste de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Segundo Silva e Gonçalves em 2010¹⁸, as espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas instáveis e extremamente reativas capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. As ERO são geradas em grande quantidade durante o estresse oxidativo, condição em que são afetadas moléculas como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácido nucleicos. O oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular, conforme Comhair et al.¹⁹.

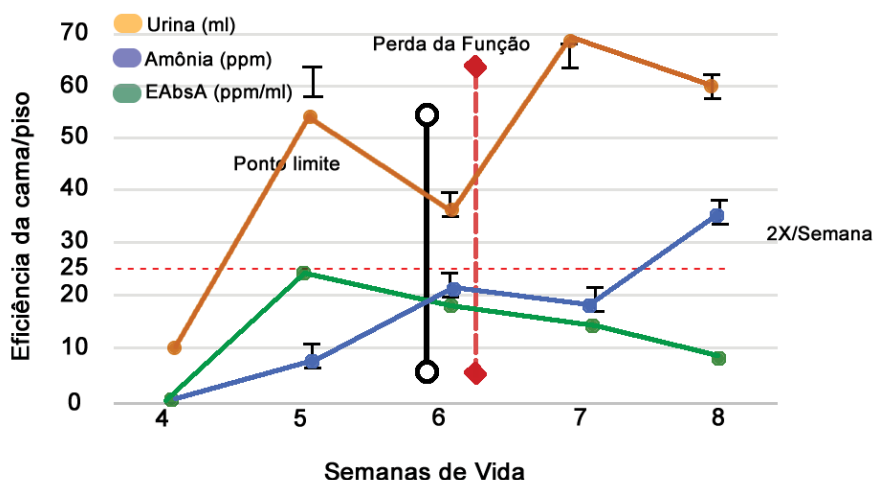


Figura 3. Estimativa de eficiência de absorção da Maravalha em duas trocas de gaiola por semana. Esse cálculo foi realizado através dos fatores: a) volume de urina para cada camundongo em sua respectiva idade (linha laranja); b) concentração de amônia no microambiente (linha azul) e c) capacidade de absorção do piso/cama maravalha em relação ao número de “trocas” semanais (linha verde). Durante as duas trocas semanais, o limite de eficiência foi indicado pelo eixo vertical em preto e a perda da função de absorção indicada pelas linhas pontilhadas vermelhas na 6ª sdv na linhagem *Swiss Webster*.

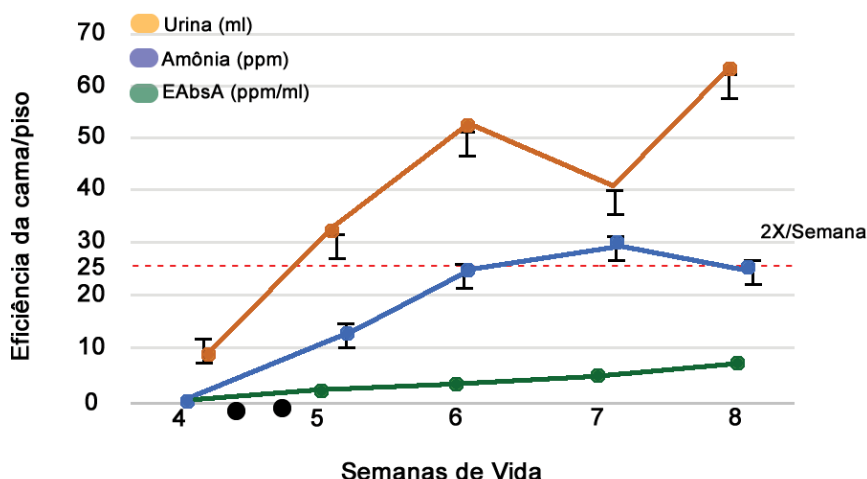


Figura 4. Eficiência do floco de *pinus* em relação à estimativa de absorção de amônia duas vezes por semana: através dos fatores principais, o volume de urina para quatro camundongos em cada idade (linha laranja), a concentração de amônia no microambiente (linha azul) e o fator de absorção para FP, dependendo do número de trocas semanais (pontos pretos) pôde-se calcular a curva de capacidade de absorção de amônia pelo piso (linha verde). O FP, em duas trocas, não perde a sua capacidade de absorção de amônia.

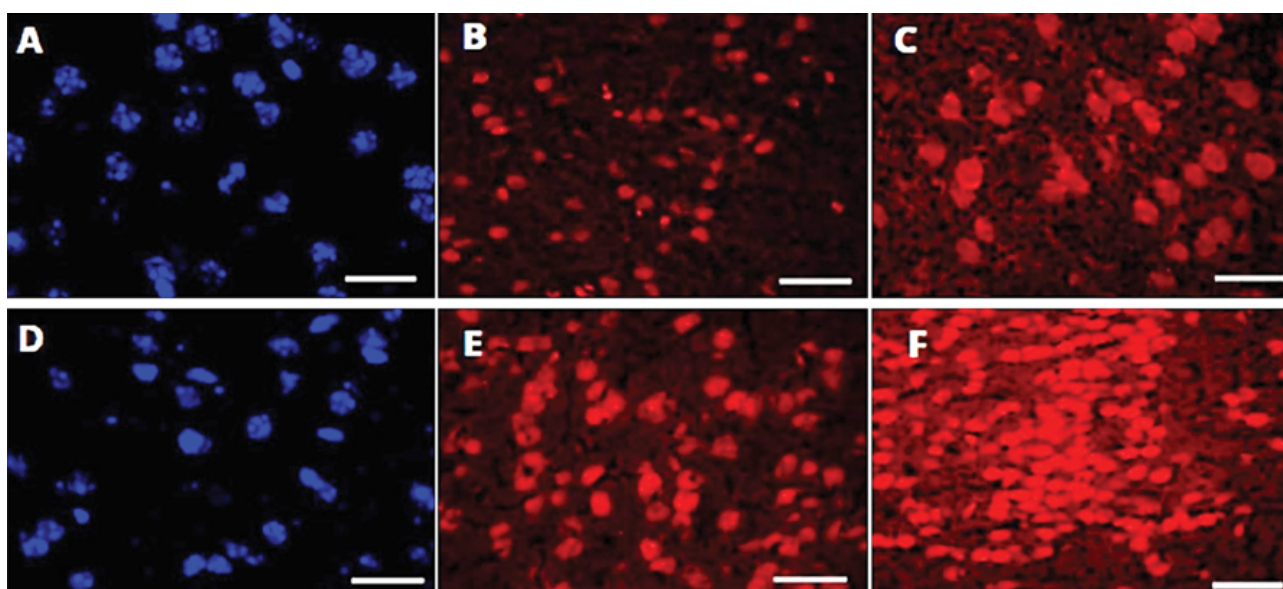


Figura 5. Teste de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) com maravalha e flocos de *pinus* duas vezes por semana: O tecido do córtex frontal de camundongos Swiss Webster sob a utilização de dois tipos de piso/cama, a maravalha (A, B e C) e o floco de *pinus* (D, E e F) sob dois protocolos de troca, duas vezes por semana (B e E) e uma troca por semana (C e F) foi cortado em micrótomo e realizada a técnica de imunofluorescência para a identificação de espécies reativas de oxigênio através de anticorpos conjugados a fluorocromos. As figuras A e D demonstraram o controle negativo com a identificação apenas do núcleo celular por DAPI, enquanto nas figuras relativas a B e C, as espécies reativas de oxigênio foram identificadas por MIF na fluorescência da rodamina que emite uma luz vermelha na marcação positiva para ERO, quando os animais utilizaram o piso/cama maravalha, a medida que, nas figuras E e F, para o piso/cama flocos de *pinus*, ocorreram dois esquemas diferentes de “troca de gaiolas” durante a semana, respectivamente.

Os resultados demonstraram a intensidade média da imunofluorescência das marcações de ERO nos neurônios (Figura 5). Para mensurar a atividade dos neurônios do córtex cerebral dos camundongos SW ao final de cada ensaio, foi realizado o teste de espécies reativas ao oxigênio e avaliada a eficiência da mitocôndria no processamento do oxigênio e a produção de ATP. Diante dos resultados apresentados, foi possível avaliar se o convívio dos animais na relação: piso/cama, frequência de troca e a concentração de amônia demonstraria um manejo que mais

promovesse o bem-estar animal aos camundongos em biotério. Por meio da análise do córtex dos animais, foi realizada a marcação de ERO por imunofluorescência (IF) e, por esta técnica, o ERO foi capaz de demonstrar a intensidade/quantidade de sua presença nas células neuronais. A média de imunofluorescência (MIF) significativa foi maior para os animais jovens com 6ª sdv (25 MIF) pelo uso de FP, em comparação com os animais mantidos em MA (13 MIF), na frequência no manejo de higienização de uma vez por semana.



DISCUSSÃO

A CAL, conforme Andrade et al., em 2006, dedica-se ao estudo da substituição dos animais por metodologias tecnocientíficas que não utilizem o modelo animal, a utilização reduzida do número de animais mantendo-se a significância estatística e o refinamento das condições ambientais e da manipulação durante o uso de animais para fins científicos e didáticos. O objetivo dos resultados dos estudos na área de CAL é que elevem a qualidade de vida dos modelos animais durante sua criação e manutenção em biotérios¹.

O refinamento abrange a padronização das condições ambientais como a luminosidade, temperatura, umidade relativa, troca de ar e outros fatores. Também é relativo à padronização dos procedimentos como a manipulação dos animais (contenção física, por exemplo) e os respectivos procedimentos para a manutenção dos animais no biotério, como, por exemplo: “troca de gaiolas”^{1,5}.

Conforme Ferrecchia et al.¹⁶, o procedimento da “troca de gaiolas” e do piso/cama dos roedores é uma atividade integral de manejo na maioria das instalações de animais de laboratório, nas quais os recursos associados ao fornecimento de camas limpas e a limpeza e autoclavagem das gaiolas e o tempo gasto pela equipe de cuidados dos animais para realizar essas tarefas são consideráveis. A “troca de gaiolas” é frequentemente realizada de acordo com um cronograma baseado em calendário para manter um microambiente limpo de acordo com os padrões humanos, embora a saúde e o bem-estar dos animais também sejam considerados¹⁷.

Memarzadeh et al.²⁰ afirmam que a troca frequente de gaiola pode ter consequências negativas não intencionais. Os roedores são altamente sensíveis aos odores e feromônios em seu microambiente, tornando a troca da gaiola e da cama um evento estressante. De tal forma, que a troca frequente de gaiola tem sido associada ao aumento de comportamentos estereotipados e agressivos em camundongos, bem como à diminuição do *score* corporal e ao aumento da mortalidade dos filhotes. Contudo, Washington e Payton, em 2016, consideraram ser uma vantagem das trocas frequentes de gaiolas e camas de camundongos, pela visível redução de resíduos no microambiente dos animais²¹.

Frente a estes questionamentos, Ferrecchia et al.¹⁶ compararam os efeitos de quatro substratos de piso/cama comumente usados (espiga de milho irradiada de ¼ pol., polpa de madeira recuperada, lascas de madeira de álamo tremedor e jornal reciclado) na geração de amônia ao alojar camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 em ambientes estáticos e ventilados individualmente (IVC). Os resultados do referido estudo sugeriram que o sabugo de milho, as lascas de madeira de álamo tremedor e as camas de jornal reciclado testados foram adequadas para troca de gaiola uma vez por semana em gaiolas estáticas e para troca a cada duas semanas para IVC. No entanto, os níveis de amônia não foram controlados adequadamente em gaiolas contendo cama de polpa de madeira recuperada e alterações patológicas ocorreram dentro de uma semana nas narinas de camundongos alojados nesta cama em gaiolas estáticas¹⁷.

Este trabalho se baseou em avaliar o tipo de piso/cama, confeccionado de MA ou FP e periodicidade de troca semanal, uma ou duas

vezes por semana para cada tipo de piso/cama. Os resultados encontrados com os animais da faixa etária de infantes (4ª sdv) demonstraram, de forma significativa, que estes podem ser mantidos tanto em MA quanto em FP, mesmo quando a “troca de gaiolas” é realizada uma vez por semana. Entretanto, nesse regime de “troca de gaiolas”, torna-se inadequada a manutenção dos animais a partir da 6ª sdv em ambos os tipos de piso/cama para os camundongos SWM.

Essa inadequação é relativa à concentração de amônia absorvido pelos diferentes tipos de piso/cama. O padrão adotado internacionalmente era considerado de 25 ppm, definido como um limite de exposição ponderado pelo tempo de 8 h. Níveis elevados de amônia podem causar degeneração subclínica e inflamação das vias nasais, rinite do epitélio olfatório e necrose em camundongos expostos¹. Balls et al., em 1995, afirmam ser a amônia a causadora de sérios danos ao sistema respiratório dos animais de laboratório²².

Diante de pouca definição literária quanto a diretrizes estabelecidas para limites de exposição à amônia em camundongos, constatou-se que a elevação da concentração de amônia na 6ª sdv foi de aproximadamente ≥ 40 ppm na utilização de MA e ≥ 30 ppm em FP, com elevação em torno de 60% para ambos os tipos de piso. Dessa forma, foi necessário interromper o ensaio, pois em ambos os pisos/camas utilizados, a frequência de “troca de gaiolas” de uma vez por semana elevou acentuadamente em 69% para MA e 66% para FP em relação à mensuração anterior, o que comprometeria a qualidade de vida dos animais quanto ao bem-estar, na continuidade de manejo para a 7ª sdv, em razão do valor padrão adotado ser de 25 ppm. Sugere-se, então, considerar não manter camundongos SWM adultos, em ambos os substratos, quando o manejo for realizado uma vez por semana, em estantes ventiladas.

Ferrecchia et al.¹⁶ demonstraram que os níveis mais elevados de amônia em uma gaiola estão nas áreas de defecação, afirmando que os locais que atingiram níveis de até 63 ppm de concentração de amônia, foram registrados nestes locais, sendo que esta diferença nos níveis de amônia em dois locais diferentes dentro das gaiolas ventiladas revela ainda mais o potencial de complexidade na avaliação do tipo de gaiola quanto à forma de manutenção de suas trocas de ar, substratos de cama e práticas de manejo.

Em relação ao comportamento dos camundongos diante dos diferentes tipos de piso/cama e da periodicidade da “troca de gaiolas”, a frequência de duas vezes por semana de higienização sugere promover nos animais uma maior atividade e interatividade social como a presença de *sniffing*, contato físico e outras interações, segundo Furtado e Oliveira em 2018²³.

A observação realizada com a frequência de “troca de gaiolas” em duas vezes por semana na dinâmica motora e exploratória dos camundongos da linhagem SW com a MA, demonstrou que este tipo de piso/cama, quando utilizados por infantes, não apresentavam alteração no seu comportamento e ocorria o aumento da atividade de repouso em relação as demais faixas etárias. Entretanto, com os animais jovens, por sua alta atividade motora e exploratória e maior evidência de excrementos, ocorria a definição de áreas de alimentação/excreção, de passagem (deambulação) e abrigo.



Esta característica se manteve nos animais adultos, porém com mais intensidade nas áreas de alimentação/excreção.

Neste trabalho, ao avaliar a eficácia de absorção da amônia, foi observado que o período no qual houve a diminuição deste fator promoveu uma elevação da concentração de amônia em ambos os pisos/cama, tanto para MA quanto para o FP. A dinâmica social dos camundongos foi alterada e considerada fator estressante.

Uma pergunta se fez presente: a frequência de “troca de gaiola” uma vez por semana, seria um fator estressor?

A resposta fisiológica ao estresse envolve um mecanismo de ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) quando o animal se encontra em uma situação de ameaça. Essa ativação estimula a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, que incita a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise e de glicocorticoides pelo córtex da adrenal²⁴.

Considerando que ocorra uma resposta ao estímulo que causa o estresse, de forma apropriada ao ambiente que o provoca, ela é considerada adaptativa²⁵. Entretanto, algumas respostas se desencadeiam de forma não adequada ao fator estressor. Neste caso, o estresse poderia ser considerado deletério quando o indivíduo for susceptível, ou o fator estressor for de intensidade e duração incapaz de adaptação do indivíduo²⁶.

Portanto, na neurobiologia, a mitocôndria²⁷ possui papel extremamente importante, pois numa situação de estresse, os neurônios no nível celular irão necessitar de energia para o mecanismo de adaptação e, novamente, dependendo da intensidade e da duração influenciarão nos vários pontos da cadeia respiratória, que por sua vez na tentativa de equilibrar a homeostasia irá produzir substâncias não desejáveis como as ERO²⁸, capaz de induzir a morte programada da célula (apoptose)²⁹ processos celulares autofágicos e outros³⁰.

A partir dessa premissa foi possível avaliar a expressão/liberação de ERO nas categorias de tipos de piso/cama e a frequência de “troca de gaiolas”.

Os resultados demonstraram que a mudança de mobilidade e a diminuição da interação social não sugerem ser resultantes (em ambos os pisos) de uma situação de estresse. Contudo, já na 6ª sdv, é possível observar um estado de estresse mal adaptado, uma vez que o ERO foi capaz de demonstrar os valores da intensidade/quantidade nas células neuronais que, com o uso de piso/cama de FP, promoveram um acentuado desconforto, principalmente sob o regime de troca de uma vez por semana.

Em ambos os tipos de piso/cama, a frequência de “troca de gaiolas” de duas vezes por semana demonstra liberação de ERO,

sendo estatisticamente significativo em FP. Quando realizada apenas uma troca semanal, a expressão de ERO é elevada de forma significativa em ambos os substratos. No entanto, a utilização de FP com somente uma troca de gaiola/semana, pode ser considerado um fator estressor para camundongos da linhagem SW, machos jovens e que pode ser atribuída a sua maior hipoa-tividade e ao fato do substrato FP ter menor oferta de conforto.

Então, o uso dos substratos MA e FP com apenas uma troca semanal promove um aumento na expressão de espécies reativas de oxigênio no córtex cerebral dos camundongos correlacionado com a presença do estado de estresse quando aplicado essa periodicidade de número de “trocas de gaiolas” por semana.

Claramente, no desenho e na execução de protocolos experimentais e para o controle da qualidade de fármacos e vacinas, evitar efeitos indesejados ao bem-estar de animais envolve a padronização das condições ambientais e a busca pela melhoria da qualidade de vida dos camundongos em seu microambiente, seja pelo refinamento do manejo ou dos materiais utilizados em sua manutenção em biotérios. A boa prática científica tem total interesse na preservação do bem-estar dos animais utilizados e na identificação, controle e sempre que possível, na eliminação dos fatores que possam causar respostas fisiológicas ou comportamentais associadas com estresse ou dor. Quando o estresse (fatores estressantes) ou a dor fizer parte de um procedimento de pesquisa, estratégias para minimizar ou controlar esses efeitos são componentes essenciais do desenho experimental⁵.

CONCLUSÃO

Em um grupo com quatro camundongos machos da linhagem SW, entre a 5ª e a 7ª sdv (jovens e adultos), pode-se afirmar que as condições ambientais, quanto à concentração de amônia ideais (≤ 25 ppm), somente se apresentará quando mantidos no piso/cama de FP com frequência de troca de duas vezes por semana. Sugere-se, então, considerar não manter camundongos SWM adultos em ambos os substratos, quando o manejo for realizado uma vez por semana, em estantes ventiladas. De forma geral, a concentração de amônia em *Swiss Webster* fêmea (SWF) foi bastante reduzida, tanto em MA quanto em FP, como também em ambos os tipos de manejo (uma ou duas trocas por semana), quando comparada com os SWM. Torna-se importante a padronização do monitoramento ambiental para cada espécie e protocolo com relação ao bem-estar animal durante o manejo. Isso propiciará o melhor procedimento para os animais mantidos em um biotério, elevando o grau de confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados dos protocolos de pesquisa e o controle da qualidade de fármacos, vacinas e testes diagnósticos na vigilância sanitária.

REFERÊNCIAS

1. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, organizadores. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2002.
2. Oliveira GM, Brück MA, Martins TVA. Enriquecimento ambiental: qual a melhor forma de utilização do enriquecimento ambiental para camundongos em biotério? Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2018.



3. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (BR). Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Diário Oficial União. 9 out 2008.
4. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (BR). Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua secretaria-executiva, cria o cadastro das instituições de uso científico de animais - Ciuca, mediante a regulamentação da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Diário Oficial União. 16 jul 2009
5. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (BR). Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação; 2023[acesso 30 ago 2023]. Disponível em: www.gov.br/mcti/pt-664/br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/publicacoes-do-665/concea/guia_concea_1ed_animais-_ensino_ou_pesquisa_2023.pdf
6. Bravin JS, Maciel-Magalhães M, Pinheiro YSG, Gonçalves MAB, Ferraris FK, Amendoeira FC. Importância da inserção de grupo controle em ensaios utilizando animais de laboratório. Vigil Sanit Debate. 2021;9(1):117-122. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.01433>
7. Silva CC, Oliveira CBN, Carneiro PS, Marengo EB, Mattos KA, Almeida RSC et al. Métodos alternativos para a detecção de pirogênicos em produtos e ambientes sujeitos a vigilância sanitária: avanços e perspectivas no Brasil a partir do reconhecimento internacional do teste de ativação de monócitos. Vigil Sanit Debate. 2018;6(1):137-49. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.01082>
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 136, de 23 de maio de 2003. dispõe sobre registro de medicamento novo. Diário Oficial União. 24 maio 2003.
9. Moraes ACN, Cabral CC, Dias AVAB, Araújo MG, Mattos GLM, Moreira WC. Comparação de períodos de observação no teste de inoculação em camundongos para o isolamento do vírus da raiva. Vigil Sanit Debate. 2015;3(3):47-55. <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00223>
10. Evangelista AA, Costa SM, Rossi MID, Oliveira GM. Wild mouse & laboratory mouse historical aspects, genetic selection and welfare. Rev Soc Bras Cienc Anim Lab. 2019;7(2):122-9.
11. Alcock J. Animal behavior, an evolutionary approach. 5a ed. Sunderland: Sinauer; 1993.
12. Graeff FG, Guimarães FS. Fundamentos de psicofarmacologia. São Paulo: Atheneu; 1999.
13. Suckow MA, Danneman P, Brayton C. The laboratory mouse. Boca Raton: CRC; 2001.
14. Gamble MR, Clough G. Ammonia build-up in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium. Lab Anim. 1976;10(2):93-104. <https://doi.org/10.1258/00236776781071477>
15. Harris AN, Lee HW, Osis G, Fang L, Webster KL, Verlander JW et al. Differences in renal ammonia metabolism in male and female kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2018;315(2):F211-22. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00084.2018>
16. Ferrecchia CE, Jensen K, Van Andel R. Intracage ammonia levels in static and individually ventilated cages housing c57bl/6 mice on 4 bedding substrates. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2014;53(2):146-51.
17. Burn CC, Mason GJ. Absorbencies of six different rodent beddings: commercially advertised absorbencies are potentially misleading. Lab Anim. 2005;39(1):68-74. <https://doi.org/10.1258/0023677052886592>
18. Silva AA, Gonçalves RC. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. Cienc Rural. 2010;40(4):994-1002. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000037>
19. Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002;283(2):L246-55. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00491.2001>
20. Memarzadeh F, Harrison PC, Riskowski GL, Henze T. Comparison of environment and mice in static and mechanically ventilated isolator cages with different air velocities and ventilation designs. Contemp Top Lab Anim Sci. 2004 Jan;43(1):14-20.
21. Washington IM, Payton ME. Ammonia levels and urine-spot characteristics as cage-change indicators for high-density individually ventilated mouse cages. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2016;55(3):260-7.
22. Balls M, Goldberg AM, Fentem JH, Broadhead CL, Burch, RL, Festing MF et al. The three Rs: the way forward: the report and recommendations of ECVAM workshop 11. Altern Lab Anim. 1995;23(6):838-66.
23. Furtado AK, Oliveira G.M. Análise Biométrica relacionada a importância do bem-estar de camundongos e a influência nos resultados dos ensaios científicos. Rev Soc Bras Cienc Anim Lab. 2018;6(2):111-28.
24. Moberg GP. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg GP, Mench JA, editors. The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. New York: CABI; 2000[acesso 20 jun 2020]. Disponível em: <https://doi.org/10.1079/9780851993591.0001>
25. Sterling P, Reason J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher S, Reason J, editors. Handbook of life stress, cognition and health. Hoboken: John Wiley & Sons; 1988.
26. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocr Rev. 2000;21(1):55-89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>



27. Ülgen DH, Ruigrok SR, Sandi C. Powering the social brain: mitochondria in social behaviour. *Curr Opin Neurobiol.* 2023;79. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102675>
28. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(Pt.2):335-44. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
29. Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 2014;112:24-49. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.10.004>
30. Miranda Mendonça AP, Hoppe LY, Gaviraghi A, Araújo-Jorge TC, de Oliveira GM, Felipe RM et al. Highly aggressive behavior induced by social stress is associated to reduced cytochrome c oxidase activity in mice brain cortex. *Neurochem Int.* 2019;126:210-17. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.03.017>

Contribuição dos Autores

Gonçalves MAB, Oliveira GM, Presgrave OAF - Concepção, planejamento (desenho do estudo), aquisição, análise e interpretação dos dados e redação do trabalho. Pessanha VS - Aquisição, análise e interpretação dos dados. Todos os autores aprovaram a versão final do trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Licença CC BY. Com essa licença os artigos são de acesso aberto que permite o uso irrestrito, a distribuição e reprodução em qualquer meio desde que o artigo original seja devidamente citado.