



Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

BIOTERISMO: REPRODUÇÃO DE CAMUNDONGOS

Carolina Leme de Azevedo

Orientadora: Dra. Carolina Madeira Lucci

Brasília – DF

MAIO/2021



CAROLINA LEME DE AZEVEDO

BIOTERISMO: REPRODUÇÃO DE CAMUNDONGOS

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Orientadora: Dra. Carolina Madeira Lucci

Brasília – DF

MAIO/2021

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

LC292b	Leme de Azevedo, Carolina Bioterismo: Reprodução de Camundongos / Carolina Leme de Azevedo; orientador Carolina Madeira Lucci. -- Brasília, 2021. 31 p.
	Monografia (Graduação - Medicina Veterinária) -- Universidade de Brasília, 2021.
	1. Reprodução. 2. Bioterismo. 3. Camundongos. I. Madeira Lucci, Carolina, orient. II. Título.

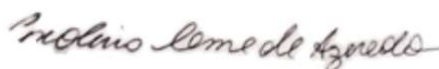
Cessão de Direitos

Nome do Autor: Carolina Leme de Azevedo

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Bioterismo: Reprodução De
Camundongos

Ano: 2021

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.



Carolina Leme de Azevedo

Folha de Aprovação

Nome do autor: Carolina Leme de Azevedo

Título: **BIOTERISMO: REPRODUÇÃO DE CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado para a conclusão do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em: / / .

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Carolina Madeira Lucci

Instituição: UnB

Julgamento:_____.

Assinatura:_____.

Maria Luiza Fascineli

Instituição: UnB

Julgamento:_____.

Assinatura:_____.

José Luiz Jivago de Paula Rolo

Instituição: UnB

Julgamento:_____.

Assinatura:_____.

Dedicatória

Em memória a minha avó, que sempre sonhou com o dia em que eu me formaria veterinária, a Greice, uma amiga muito querida que alegrava meus dias na aula e a Bes, sem ela eu nunca teria chegado até aqui, infelizmente vocês não estão mais aqui para ler esta dedicatória, mas meu amor por vocês será eterno.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Professora Doutora Carolina Madeira Lucci pela confiança, paciência, ensinamentos e ajuda durante toda minha jornada na UnB, sem um orientador nenhum trabalho acadêmico seria concluído.

Agradeço também a minha mãe Adriana Caschera Leme que esteve sempre do meu lado e me ajudou a persistir. Ao meu pai Ricardo Bentes de Azevedo, que aguentou os altos e baixos da minha jornada. A minha irmã Mariana Leme de Azevedo e ao meu irmão Rodrigo Leme Reis. A minha família, que me apoiou e acreditou em mim mesmo quando eu não acreditei. Aos amigos que durante esse processo tiraram dúvidas, leram os rascunhos e me ajudaram com a compaixão de quem também está passando pelo processo de conclusão do curso.

E também agradeço a Dra. Martha Rocha que desde o início dessa jornada sempre me apoiou e me ensinou muito, assim como as M.V. Dayana Itai, Stefani Souza e Larissa Borges. E à M.V. Michele Brito que me recebeu com muito carinho e paciência para meu estágio final. Obrigada a todas pelo aprendizado e pelo carinho!

Obrigada a todos aqueles que acreditaram e esperaram por esse trabalho pacientemente. E agradeço a UnB por esses anos e essa experiência tão transformadora.

Sumário

1. Introdução	1
2. História do Uso de animais em pesquisa e espécies utilizadas	2
3. Camundongos.....	5
4. Manejo de Camundongos em Biotério.....	7
5. Reprodução de Camundongos.....	11
5.1. Acasalamento.....	15
5.2. Prenhez, parto e amamentação.....	18
6. Estratégias de Melhoria na Reprodução de Camundongos em Biotério.....	21
7. Ética no uso Animal.....	24
7.1. Alternativas ao uso animal.....	25
8. Considerações Finais.....	27
9. Referências Bibliográficas.....	28

Resumo

O objetivo deste trabalho é compilar informações sobre a reprodução e criação de camundongos em biotério para uso em pesquisa, voltando-se à produção ética desses animais que atualmente ainda são insubstituíveis para esse propósito. O trabalho aborda o histórico dos animais na pesquisa, o ciclo reprodutivo completo de camundongos, reprodução, prenhez, parto, amamentação e desmame assim como considerações sobre a ética do uso de animais em experimentação e o bem-estar animal. Concluindo o uso dos animais em pesquisa é fundamental e, portanto, conhecer sua reprodução e os produzir de maneira ética é importante nos dias atuais.

Palavras-chave: camundongos, roedores, reprodução, acasalamento, bioterismo

Abstract

The objective of this paper is to compile information about bioterium mouse reproduction and breeding for the use in research, with focus on ethical production of these animals that are still irreplaceable as an experimental model. The paper approaches the history of animal use in research, the complete mouse reproductive cycle, reproduction, pregnancy, delivery, nursing and weaning, as well as considerations about the ethics of animal use in experimentation and their well-being. In conclusion the use of animals for research is essential and, therefore, knowing its reproduction and producing them in an ethical manner is important nowadays.

Keywords: mouse, rodents, reproduction, breeding, animal facility

1. Introdução

Animais, principalmente mamíferos, são utilizados em pesquisa primariamente por possuírem sistemas de órgãos com funções e anatomia similares aos de humanos. Além disso compartilhamos 99% do nosso DnA com camundongos e estudando como esses genes funcionam nesses animais nos ajuda a entender como eles funcionam em nós. Essa similaridade também significa que medicamentos que funcionam e são seguros para animais tem maior chance de serem seguros para uso em humanos e hoje, por lei, medicamentos devem ser testados em animais antes da sua aprovação.

Estudos em seres vivos trouxeram inovações que causaram a melhora na qualidade de vida de pessoas e animais e é necessário lembrar que os últimos também se beneficiam da experimentação animal.

A espécie animal mais utilizada em experimentação são os camundongos. Este trabalho traz uma revisão a respeito da criação e da reprodução de camundongos em biotério para fins de pesquisa científica.

2. História do uso de animais na pesquisa e espécies utilizadas

O uso de animais em pesquisa data desde 400 anos AC, quando cientistas dissecavam e necropsiavam esses para estudos anatômicos e funcionais dos diversos sistemas do organismo (Fontes & Santos, 2013). Os modelos animais são utilizados principalmente em pesquisas biomédicas, e as espécies mais comuns (Figura 1) são os roedores: camundongo (*Mus musculus*), ratos (*Rattus norvegicus*), cobaia ou porquinho da Índia (*Cavia porcellus*), hamster (*Mesocricetus auratus*), gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) e o lagomorfo: coelho (*Oryctolagus cuniculus*) (Fontes & Santos, 2013).

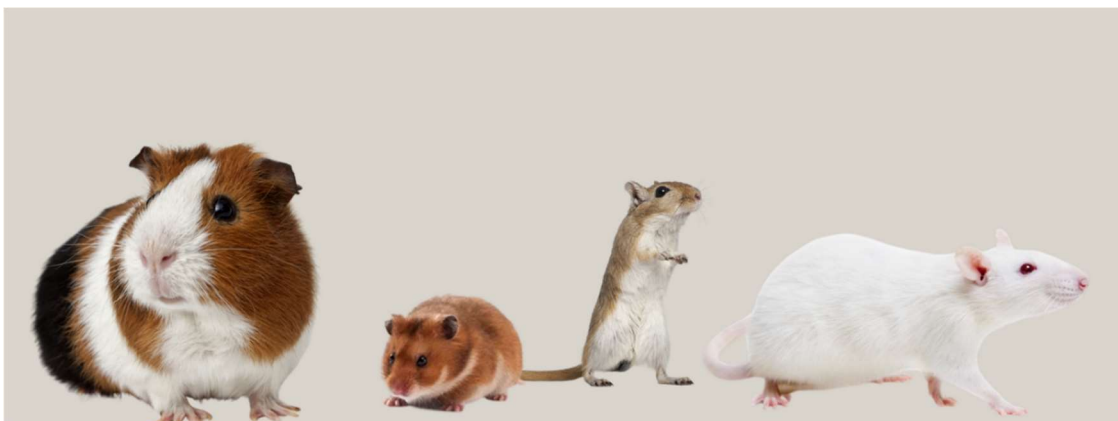


Figura 1. Da esquerda para a direita: Porquinho da Índia, Hamster, Gerbilo da Mongólia, e rato. Adaptado de: [https://www.parents.com/parenting/pets/kids/picking-the-perfect-pet/\(17/04/21\);](https://www.parents.com/parenting/pets/kids/picking-the-perfect-pet/(17/04/21);) [https://www.criver.com/products-services/find-model/lvg-golden-syrian-hamster\(17/04/21\);](https://www.criver.com/products-services/find-model/lvg-golden-syrian-hamster(17/04/21);) [https://www.omlet.co.uk/guide/gerbils/getting_a_gerbil/breeds\(17/04/21\);](https://www.omlet.co.uk/guide/gerbils/getting_a_gerbil/breeds(17/04/21);) <http://www.vezdavo.com.br/wp-content/uploads/2018/03/rato-branco.jpg>

Coelhos foram os animais utilizados por Louis Pasteur nos experimentos que levaram ao desenvolvimento da primeira vacina (Rappuoli, 2014). Além disso, são frequentemente utilizados em pesquisas envolvendo ateroscleroses, osteoporoses, doenças oculares, imunologia, produção de anticorpos, implantes biomédicos, farmacologia, toxicidade, entre outros (Hickman et al., 2017).

Outro animal usado em experimentação é o gerbilo, o da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) é o mais comum nos Estados Unidos, que por características anatômicas no cérebro é mais utilizado como modelo para isquemias e infartos cerebrais (Hickman et al., 2017).

Existem diversas espécies de hamsters que são utilizadas na pesquisa, sendo o Sírio (*Mesocricetus auratus*) o mais comum. Foram inicialmente utilizados em estudos em infectologia, parasitologia e doenças dentais e mais recentemente em estudos oncológicos, metabólicos, cardiológicos, reprodutivos e endocrinológicos (Hickman et al., 2017).

Porquinhos da Índia (*Cavia porcellus*) tem um importante papel na história da pesquisa, sendo usados desde 1600 em pesquisas de anatomia e posteriormente por Louis Pasteur e Robert Koch em estudos de infectologia, mais recentemente estão sendo utilizados em estudos sobre a doença de Alzheimer. Em questões fisiológicas esses animais são parecidos com os seres humanos hormonalmente, imunologicamente e fisiologicamente. Uma de suas particularidades é sua necessidade de suplementação de vitamina C (Hickman et al., 2017).

Os ratos (*Rattus norvegicus*) são a segunda espécie mais utilizada em pesquisas científicas, perdendo apenas para os camundongos. Acredita-se que os ratos constituem aproximadamente 15% do total de animais utilizados em pesquisa científica. Seu uso vai desde pesquisa básica e aplicada nas diferentes áreas, tais como nutrição, genética, imunologia, neurologia, doenças infecciosas, doenças metabólicas, câncer, novos fármacos, estudos de toxicidade, comportamento, entre outros (Hickman et al., 2017)

Camundongos (Figura 2) convivem a milhões de anos com os seres humanos, com registros do seu uso em experimentação científica desde 1664, sendo que após sua domesticação no século 20 a espécie se transformou em um dos animais mais importantes e utilizados na pesquisa biomédica e ensaios biológicos (Hedrich & Bullock, 2004).



Figura 2: Camundongo. Fonte:

http://static.tumblr.com/aahrks/Mfsnglzb0/istock_000012365316medium.jpg

Acesso em: 18/05/2021

3. Camundongos

Camundongos possuem doenças similares a de humanos, além de terem um tempo curto entre gerações e outras características interessantes para seu uso em experimentos. Apesar desses animais terem sido utilizados, provavelmente, por conveniência, nos dias de hoje existem diversas razões científicas para a preferência de seu uso pelos pesquisadores, como: sua docilidade, facilidade de manipulação, ciclo de vida curto, reprodução fácil e não sazonal, flexibilidade em relação a necessidades nutricionais, tamanho pequeno e fácil manutenção. Além disso possuem o perfil genético mais conhecido, ferramenta fundamental para manipulação genética e possibilitando estudos em diversas áreas da Ciência, como Nutrição, Genética, Imunologia, Farmacologia, Embriologia, entre outras.

Camundongos são usados como modelo para doenças humanas, principalmente em estudos sobre possíveis tratamentos e curas, em trabalhos sobre comportamento, nutrição e genética, estudos imunológicos, neurológicos, toxicidade e vários outros. Para alguns tipos de estudos existe a necessidade do uso de animais com genética específica, como imunodeficiências, pouca variabilidade genética e outras particularidades (Hickman et al., 2017). Por suas linhagens terem sido, com poucas exceções, extensivamente documentadas, é sabido que a origem do camundongo de laboratório são quatro subespécies (*Mus musculus musculus*, *Mus musculus domesticus*, *Mus musculus castaneus* e a *Mus musculus molossinus*) que foram hibridizadas ao longo do tempo por fornecedores dos animais para cientistas (Hedrich & Bullock, 2004).

Camundongos como animais de laboratório são classificados em dois grandes grupos: 1) consanguíneos ou isogênicos (do inglês inbred) e que também incluem os mutantes e geneticamente modificados; 2) os não-consanguíneos ou heterogênicos (outbred) (Andrade et al., 2002).

Linhagens consanguíneas foram desenvolvidas para atender às necessidades específicas de pesquisa, como por exemplo quando se precisa animais geneticamente idênticos (Tabela 1) (National Research Council, 2011). Por outro lado, os não consanguíneos garantem a heterogeneidade genética de longo

prazo das colônias reprodutoras, bem como podem ser utilizados quando não houver necessidade de animais geneticamente idênticos (Tabela 1) (National Research Council, 2011).

Tabela 1. Linhagens de Camundongos Disponíveis para Uso em Pesquisa.

LINHAGENS DE CAMUNDONGOS DISPONÍVEIS PARA USO EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL			
MODELO	GERAÇÃO	USOS	EXEMPLOS
Linhagem consanguínea	20 ou mais gerações consecutivas de acasalamentos entre irmãos ou pais	Estudos que exigem animais geneticamente idênticos	BALB/c, C3H, C57BL/6, CBA, DBA/2, C57BL/10, AKR, A, 129, SJL
Linhagem sem consanguinidade	Acasalamento deliberado de animais sem parentesco	Estudos que exigem o vigor de animais não consanguíneos	Swiss Webster, CD-1, ICR
Mutação espontânea	Linhagens criadas para manter mutações que ocorreram espontaneamente	Estudos sobre doenças associadas com a a mutação espontânea	Athymic nude, nonobese diabetic (NOD)
Camundongos geneticamente modificados	Camundongos com genes que foram ativados ou desativados	Estudos que buscam identificar a função de certos genes	
Camundongos transgênicos	Camundongos com genes de espécies não relacionadas inseridos em seu genoma	Estudos que exigem um modelo de doenças e toxicologia humanas	

Adaptado de: Hickman et al.; 2017

Segundo Fahey et al. (2013) “existe o potencial de gerar mais de 200.000 linhagens de camundongos mutantes entre linhagens de camundongos existentes (mais de 24.000) e células-tronco embrionárias de camundongo geneticamente modificadas (mais de 209.000) que foram inseridas no International Mouse Strain Resource Center (IMSR) de laboratórios e repositórios no mundo todo”.

Aqui cabe reforçar que toda essa diversidade é uma ferramenta importante na biomedicina e contribui para o nosso entendimento sobre genética, doenças, biologia, novas terapia, desenvolvimento de drogas e outros conhecimentos (Murray & Parker, 2005).

4. Manejo de camundongos em biotério

Como colocado anteriormente, por seu pequeno tamanho, facilidade de manuseio, ciclo reprodutivo curto, temperamento dócil entre outras razões, o camundongo é o modelo animal mais utilizado em pesquisa (Hickman et al., 2017).

Como todos os roedores, camundongos são animais sociais e, portanto, mantê-los sozinhos pode trazer prejuízos a sua saúde e reprodução, em contrapartida é necessário que o número de animais seja cuidadosamente considerado para que não ocorra superpopulação, o que também é prejudicial aos animais e seu bem-estar (Allen et al., 2016).

Dois tipos de gaiolas (Figura 3) podem ser usados para abrigar os camundongos: as de fundo sólido e as de fundo perfurado, sendo que as de fundo sólido são mais utilizadas, podendo ser de metal ou plástico e devendo ser resistentes à autoclavação. Gaiolas de ferro galvanizado são menos aconselhadas que as de aço inoxidável por acabarem contaminando os animais que podem lamber as paredes ou até mesmo por lamber seus pelos que estiveram em contato com esta (Andrade et al., 2002). As mais utilizadas são feitas de plástico, por seu preço, durabilidade e por serem mais baratas. Não podem existir “cantos vivos” na gaiola que os animais possam roer para escapar, por isso normalmente são retangulares de tamanho 30cmx20cmx13cm (Neves et al., 2013) com uma “tampa” de aço que permite a colocação da ração e de bebedouro, se a tampa impedir muito a ventilação é necessária a adição de filtros ou campânulas para que a amônia da urina dos animais não se acumule no seu interior sendo o ideal o uso de sistemas de ventilação forçada (Andrade et al., 2002). Podemos ainda ter gaiolas individualmente ventiladas (Neves et al., 2013), sistema importante para linhagens com imunidade comprometida.

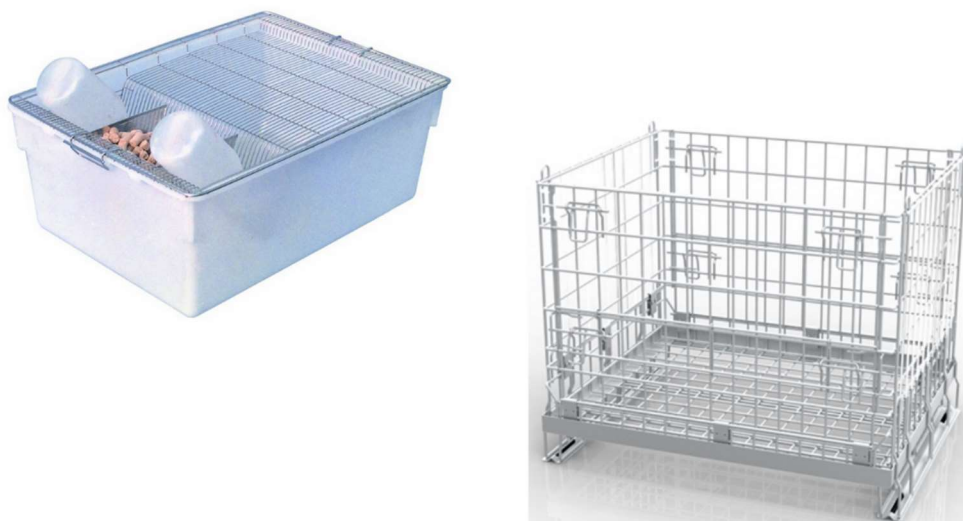


Figura 3: Da esquerda para a direita gaiola de fundo sólido e gaiola de fundo perfurado. Adaptado de: <https://portuguese.alibaba.com/product-detail/plastic-rat-mouse-breeding-cages-laboratory-rat-cages-60537281799.html> (Acesso em: 10/05/2021) e <https://www.mevisametal.com.br/gaiolas-customizadas> (Acesso em: 10/05/2021)

Camundongos em ambientes superpovoados ou em isolamento desenvolvem estresse, o espaço mínimo necessário por animal é aquele que permite que todo animal possa se mover e apresentar postura e comportamento da espécie (Andrade et al., 2002) e permitir que um animal que seja confrontado por outro possa se retirar da situação. O espaço físico recomendado pode ser observado na tabela 2, lembrando que o espaço é referente à área de piso em relação a peso de animal.

Tabela 2.: Manejo de camundongos de laboratório.

Manejo de camundongos em biotério	
Área de piso requerido	
<10 g	38,7 cm²
Até 15 g	51,6 cm²
Até 25 g	77,4 cm²
>25 g	96,7 cm²
Fêmea com filhotes	330 cm²
Altura requerida da gaiola	12,7cm
Temperatura	20-24°C
Umidade Relativa do ar	50±10%
Foto período	12/12 ou 14/10
Limite de ruídos	50 - ≤85dB
Ingestão diária de alimento	4-8g
Ingestão diária de água	5-8ml

Fonte: RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA Nº 15, de 16 de dezembro 2013

A Tabela 2 traz também as condições necessárias à criação de camundongos em biotério.

É necessário o uso de um sistema de ar-condicionado central para a ventilação e controle de temperatura e umidade relativa que devem ser mantidos a 22 ± 2 °C e $50\pm 10\%$ respectivamente, sendo que a ventilação das salas deve ter pressão positiva em relação ao corredor para evitar contaminação (Neves et al., 2013). Mudanças bruscas de temperatura provocam estresse, aumentando a susceptibilidade dos animais a doenças sendo que temperaturas altas provocam queda na reprodução e até sua parada total, e temperaturas baixas podem provocar afecções respiratórias. A liberação contínua de vapor d'água, através da respiração e a evaporação da urina aumenta a umidade do ambiente e essa umidade muito alta causa problemas respiratórios, criando a necessidade de um sistema que retire o excesso de água do ambiente, sem retirar essa excessivamente, com o risco de

tornar o ambiente muito seco, o que provoca ressecamento de mucosas e pele e o surgimento de feridas nos animais (Neves et al., 2013).

A iluminação deve ser feita por lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 12-14h de claro e 10-12h de escuro para melhor performance reprodutiva de preferência com temporizadores digitais (Neves et al., 2013). Devendo se lembrar que camundongos são animais noturnos e a luz fria lhes é menos incômoda que a luz incandescente (Andrade et al., 2002).

A água é uma importante fonte de contaminação e, portanto, a oferecida aos animais deve ser esterilizada e trocada com frequência, sendo oferecida *ad libitum* em frascos autoclaváveis e de preferência transparentes para que sujidades sejam mais facilmente identificadas, sempre verificando se há entupimentos que possam impedir os animais de beber a água (Andrade et al., 2002). A ração também deve ser oferecida *ad libitum* e o ideal é que seja industrializada, o que garante que o requerimento nutricional dos animais seja alcançado, e também deve ser autoclavável para evitar contaminação. Caso seja necessário o uso de suplementação ou alimento fresco estes devem ser guardados em local protegido e em pouca quantidade (Andrade et al., 2002).

Além desses cuidados básicos, todo biotério deve ter um programa de controle sanitário que deve considerar os seguintes aspectos: a prevenção de condições que podem favorecer o estabelecimento de doenças através de barreiras sanitárias, manejo adequado dos animais, o foco no bem-estar para evitar o estresse dos animais e higienização adequada do ambiente, equipamentos e materiais utilizados no local; Avaliação sistemática dos animais para detectar infecções latentes através de testes laboratoriais e; o manejo de enfermidades com a identificação da doença, inibição de propagação desta e eliminando o agente causador (Andrade et al., 2002).

5. Reprodução de camundongos

O objetivo de um sistema de criação de biotério é obter filhotes saudáveis e rastreáveis para uso em experimentos que exijam animais geneticamente parecidos, diminuindo assim as variáveis dos estudos. As seguintes etapas serão consideradas em relação ao manejo que estimule a reprodução e criação de filhotes sadios de modo que seja possível obter registros e rastros genéticos para controle. No contexto da reprodução, o registro dos animais é essencial para que caso ocorram problemas reprodutivos, e, caso ocorram, suas causas sejam mais facilmente identificáveis. Murray & Parker (2005) recomenda reter informações como: raça, genótipo, parentalidade, registros médicos, idade, sexo, histórico reprodutivo e status de saúde. O número geracional e a data de entrada na colônia também são informações relevantes.

Camundongos se reproduzem rapidamente, com a gestação durando em torno de 21 dias e os filhotes se tornando capazes de sobreviver sozinhos aproximadamente aos 21 dias de idade e iniciando a puberdade aproximadamente às 4 semanas (Wasson, 2017). A Tabela 3 mostra os dados reprodutivos para camundongos.

Tabela 3: Dados biológicos reprodutivos de camundongos.

Dados Biológicos de Camundongos	
Puberdade	42 dias de idade
Peso na puberdade	20-25g
Maturidade sexual	60 dias
Ciclo estral	4-5 dias
Período de gestação	19-21 dias
Aleitamento	19-21 dias
Vida reprodutiva	Macho: 1 ano Fêmea: 6-8 partos
Tamanho da ninhada	10-12 filhotes (<i>outbred</i>)
Peso ao nascer	1-2g
Idade para desmame	21 dias
Peso ao desmame	10-12 g

Fonte: Chorilli et al. 2007

A puberdade pode ser definida, de acordo com o livro “The Mouse in Biomedical Research” de 2007, como uma série de mudanças que resultam no estabelecimento das funções reprodutivas e se inicia em resposta a estímulos sociais, metabólicos e ambientais. O tempo para que essa resposta ocorra varia de acordo com a linhagem, mas a exposição a feromônios de animais sexualmente maduros parece ter um papel importante no desenvolvimento sexual. Os sinais da puberdade em fêmeas incluem a abertura da vagina, cornificação dos esfregaços vaginais, comportamento de aceitação da corte do macho e a habilidade de engravidar e levar a gravidez a termo.

Em machos os sinais da puberdade são o surgimento da libido e a presença dos testículos no saco escrotal, além da habilidade de produzir espermatozoides funcionais e capazes de fertilizar a fêmea gerando uma gestação.

Após a puberdade a espermatogênese continua por toda a vida do macho e para que ela ocorra é necessário: a presença de células tronco (espermatogônias) que se renovam a cada ciclo, a ocorrência da meiose dessas células e a diferenciação delas em um espermatozoide especializado e com motilidade. Esse ciclo ocorre sincronicamente com um grupo de células que primeiro se divide por mitose e posteriormente por meiose se tornando espermatócitos (diploides) e por último em espermátides (haploides). Durante este processo, as células migram desde a proximidade da membrana basal em direção ao lúmen do túbulo seminífero, sendo sempre nutridas pelas células de Sertoli. Em seguida, as espermátides passam por um processo de diferenciação, que altera seu formato com a perda de citoplasma e a formação de estruturas especializadas, as transformando em espermatozoides, com as células se aproximando cada vez mais do lúmen dos túbulos seminíferos com suas caudas projetando-se para a luz. Os espermatozoides são liberados ainda sem motilidade e transportados para o epidídimo onde finalmente adquirem motilidade. Esse processo, nos camundongos, é controlado por hormônios e dura em torno de 34,5 dias e se inicia a cada 8,6 dias, por isso é necessário descanso entre cruzas para machos que são utilizados frequentemente. A capacidade de fertilização desses espermatozoides começa a declinar com a idade aproximada de 10-12 meses e é quando os animais são normalmente aposentados (Fox et al., 2007).

O ciclo reprodutivo da fêmea de camundongo é chamado de ciclo estral e dura em torno de 4-6 dias, sendo interrompido por gravidez, pseudogestação e pelo anestro, sendo a duração do ciclo diferente para cada linhagem, outros fatores que influenciam esse ciclo são: estresse, dieta e feromônios de machos sexualmente maduro. De acordo com o livro *The Mouse in Biomedical Research* (Fox et al., 2007), o ciclo estral é dividido em quatro etapas (Tabela 4), a saber:

Proestro: É a fase em que os folículos antrais se desenvolvem com concentrações altas de estrogênios que estimulam a divisão celular na mucosa vaginal e no útero, e com o pico de estrogênio causa a liberação do hormônio luteinizante. Nessa fase a abertura da vulva é rosa, úmida, estriada e inchada, com o esfregaço vaginal apresentando células epiteliais nucleadas refletindo o efeito do estrogênio no tecido.

Estro: É a fase em que a fêmea está receptiva ao macho por causa dos níveis elevados de estrogênio e com a ocorrência da ovulação que junto com o hormônio luteinizante forma o corpo lúteo no ovário. O epitélio vaginal está em sua espessura máxima e descama células cornificadas que aparecem no esfregaço e a vulva está menos inchada e mais avermelhada.

Metaestro: Durante essa fase, o corpo lúteo já está formado e o declínio do nível de estrogênio se inicia, o que interrompe o crescimento do epitélio uterino que começa a mostrar sinais de degeneração. No esfregaço vaginal são encontrados leucócitos juntamente com células nucleadas aderidas umas às outras. A vulva não está mais inchada e a abertura vaginal externa se fecha.

Diestro: é a fase de quiescência. Os níveis de estrogênio ainda estão baixos e na ausência de acasalamento o corpo lúteo não foi estimulado e produz pouca progesterona, a parede do útero está descamada com os esfregaços vaginais mostrando células epiteliais e leucócitos e com a vulva pálida, seca e fechada.

Tabela 4: Aparência da vagina em diferentes estágios do ciclo estral.

Aparência da vagina nos diferentes estágios do ciclo estral	
Estágio do ciclo	Aparência
Diestro	A vagina tem uma abertura pequena e os tecidos são de cor azulada/arroxeados e bastante úmidos
Proestro	A vagina está aberta e os tecidos estão rosados//avermelhados, úmidos e dobras longitudinais e estriações são observadas nos lábios ventrais e dorsais
Estro	Parecido com o proestro, mas menos avermelhada e úmida e com as estriações mais pronunciadas
Metaestro	O tecido da vagina está pálido e seco

Adaptado de: Fox et al.; 2017

As fêmeas de camundongo passam por um estro pós-parto que permite uma produção contínua de filhotes com o término da gestação coincidindo com o desmame da ninhada anterior (Wasson, 2017) e sua vida reprodutiva dura em torno de 6-8 partos (Chorilli et al., 2007).

É necessário ressaltar que a performance reprodutiva varia entre linhagens. As principais diferenças podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros reprodutivos de linhagens comuns de camundongos utilizadas em laboratório.

Parâmetros Reprodutivos de Linhagens Comuns de Camundongos Utilizadas em Laboratório						
Linhagem	Idade de acasalamento (semanas)	Idade ao nascimento da primeira ninhada (semanas)	Média do tamanho da ninhada	Proporção de animais desmamados em relação aos nascidos	Proporção de fêmeas (%)	Ninhadas por fêmea
BALB/c ByJ	6.38	10.91	4.71	0.86	55.59	4.37
CBA/J	7.03	10.96	4.02	0.84	49.34	4.9
C3H/HeJ	7.15	10.45	5.64	0.89	49.58	4.58
DBA/2J	8.03	11.63	5.31	0.79	47.42	4.78
C57BL/6J	7.31	11.29	5.84	0.80	52	4.9
Crl:CD1(SW)	7	10.21	11.24	0.996	50	NA

Adaptado de: Fox et al.; 2017

5.1. Acasalamento

A cópula de camundongos normalmente ocorre durante o ciclo escuro, e o comportamento reprodutivo é facilmente identificado. De acordo com Fox et al. (2007), o macho se aproxima da fêmea e a fareja e a segue se colocando na frente ou até embaixo dela, após esse período de corte a fêmea permite que o macho a monte e a cópula ocorre. Após a ejaculação o macho colapsa caindo de lado, às vezes levando a fêmea junto, e muitas vezes eles executam um *grooming* pós-acasalamento. O sucesso da cópula é verificado pela presença do tampão vaginal, um objeto firme, esbranquiçado que cobre a vagina da fêmea que impede que ela reproduza com outros machos e promove estímulo necessário para manter o corpo lúteo. O tampão vaginal (Figura 4) normalmente permanece por 48h após o coito e impede que a fêmea acasale novamente, além de servir de estímulo para a manutenção do corpo lúteo e reter o ejaculado no útero da fêmea (Wasson, 2017).

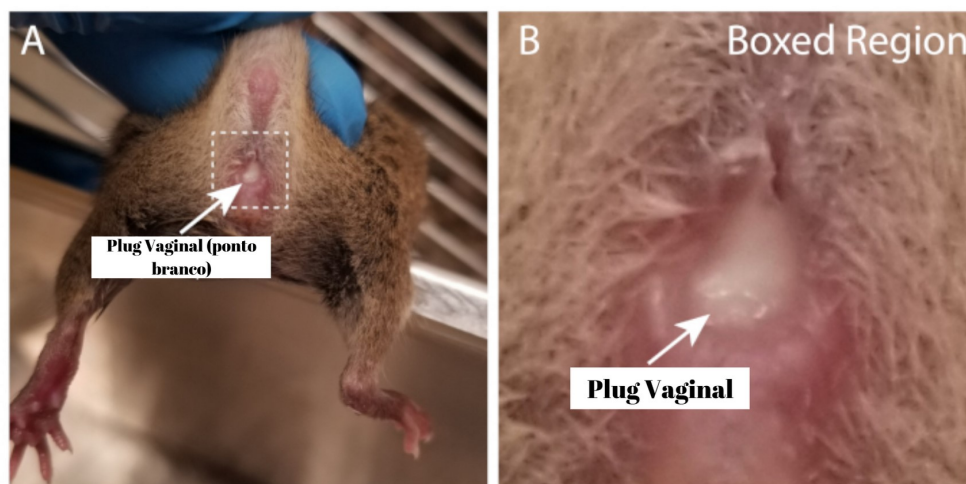


Figura 4: Tampão vaginal em camundongo fêmea pós-acasalamento. Adaptado de: <https://www.jove.com/t/60558?language=Portuguese> (acesso em: 06/05/2021)

De acordo com Murray & Parker (2005) os sistemas de acasalamento se encaixam em dois grupos, aqueles que mantêm machos e fêmeas juntos de maneira permanente e aqueles que os colocam juntos temporariamente (acasalamento cronometrado).

Quando os animais coabitam permanentemente é mais comum que se utilizem o sistema monogâmico ou de harém. No sistema monogâmico convivem apenas um casal, enquanto no harém um macho coabita com duas ou mais fêmeas. Em ambos os sistemas os filhotes são removidos da gaiola após o desmame. As estatísticas descritivas de Wasson (2017) sugere que acasalamentos em trio um filhote adicional por ninhada é desmamado, mas não se sabe a significância biológica deste dado.

Quando a coabitação é temporária o sistema é poligâmico, onde um macho é colocado com duas ou mais fêmeas sendo que Lapchik et al. (2017)

sugere que sejam colocadas no máximo quatro fêmeas, em uma gaiola e os animais que apresentarem sinais de acasalamento são removidos da gaiola e transportados para uma gaiola de maternidade com outras fêmeas ou sozinhas e após o desmame elas retornam para a gaiola de reprodução.

Em uma colônia pode ser benéfico o uso de acasalamentos cronometrados. Existem dois métodos básicos para realizar o acasalamento cronometrado. No primeiro, fêmeas no pró-estro são colocadas com os machos e examinadas na manhã seguinte para determinar o sucesso da cópula pela presença do tampão vaginal. Este método apresenta uma taxa de 80-90% de sucesso (presença de tampão). O estágio do ciclo estral da fêmea pode ser determinado pela observação da genitália externa e por lâminas de esfregaços vaginais (Fox et al., 2017). Em alguns casos específicos, como a colheita de embriões de fêmeas geneticamente valiosas, a aplicação de gonadotrofinas pode ser utilizada (Fox et al., 2017). Como em condições normais uma proporção pequena dos animais estará nesse estágio desejado (pró-estro) no mesmo dia, esse método requer um número maior de animais para a seleção.

No segundo método as fêmeas são colocadas com os machos independentemente do momento do ciclo em que estão, a taxa de sucesso nesse caso é de 75-80% após o quarto dia sendo que os animais devem ser checados diariamente para determinar a presença do tampão vaginal. Apesar do sucesso ser menor, o número de animais necessários também o é, e outra vantagem desse método é que a presença do macho estimula o estro em fêmeas que convivem juntas continuamente e que estão com ciclos infrequentes.

Antes de utilizar machos nesse tipo de cruzamento é importante que eles sejam testados para determinar sua fertilidade através de cruzas de teste, esperando por sinais de gravidez até a segunda semana após a visualização do tampão vaginal. Caso nenhuma das fêmeas apresente sinais de prenhez durante este teste o macho não deve ser utilizado no acasalamento cronometrado, mas pode ser usado em outros tipos de acasalamento, caso sua genética seja valiosa. É necessário lembrar que uma semana de descanso entre cruzas é necessária para que o macho mantenha a libido e a contagem de espermatozoides adequada.

Lapchik et al. (2017) sugere que para a avaliação da produtividade os seguintes dados sejam coletados: média do tamanho da ninhada, média de intervalo entre ninhadas, índice da ninhada, mortalidade pré-desmame, produtividade, taxa de fertilidade, índice de natalidade, taxa de prolificidade e taxa de desmame.

5.2. Prenhez, parto e amamentação

A fertilização ocorre no oviduto e o ovócito se mantém no local por 18-22h após a fertilização quando o embrião inicia a jornada para o útero. No quarto dia a zona pelúcida é perdida e o processo de implantação se inicia. Nesse momento tanto o estrógeno quanto a progesterona são necessários para o transporte e desenvolvimento do embrião que ao interagir com o oviduto causa um aumento atividade secretória que ajuda o processo de transporte (Fox et al., 2007).

Já no útero o embrião entra em contato íntimo com os tecidos maternos primeiro se posicionando junto a parede uterina (dia 4) ao mesmo tempo em que o lúmen uterino é fechado e o edema pressiona os embriões. Eles então se aderem ao epitélio, cuja capilaridade aumenta em áreas de contato com esses. Após a adesão as células embrionárias invadem o epitélio se colocando em contato com o sangue materno. Em resposta a essa invasão o estroma se diferencia e envolve o embrião provendo nutrição. Este processo é chamado implantação (Fox et al., 2007).

O estabelecimento do corpo lúteo é fundamental para a manutenção da gravidez. O estímulo do tampão vaginal mantém o corpo lúteo apenas nos primeiros dias de gestação e após o dia 11 a placenta é a responsável por estimular esse corpo, para que ele não entre em apoptose, através da produção de prolactina (Fox et al., 2007).

A gestação dura em torno de 21 dias variando entre linhagens, mas sempre com influência direta da massa fetal. A média de filhotes/parto é de 8-10 em linhagens *outbred* e em torno de 5 filhotes/parto em linhagens *inbred* (Andrade et al., 2002).

O parto é iniciado pelos fetos que sinalizam sua maturidade fazendo com que a expressão dos receptores de progesterona diminua, aumentando a contratilidade uterina e aumentando a síntese de prostaglandinas. A ocitocina e a relaxina participam do processo de contração uterina e abertura da cérvix, mas não são essenciais, com estudos com camundongos deficientes nesses hormônios conseguindo ter um parto saudável, apenas com um processo mais longo (Andrade et al., 2002).

Em geral, camundongos nascem desprovidos de pelos, com exceção das vibrissas (pelos táteis) e tem o peso ao nascer de 1-2g (USP – Biotério, 2003), com o desmame ocorrendo aos 21 dias de idade os filhotes tendo o peso de 10-15g (Figura 5).



Figura 5: Perfil de desenvolvimento de camundongos. Dados não publicados, obtidos do Biotério FCF-IQ/USP

Após o parto, a fêmea amamenta a ninhada e é possível observar o leite no estômago dos animais pela mancha branca nos seus abdomens. Como animais que mamam demonstram melhor habilidade de sobrevivência, este é um aspecto que pode ser utilizado em caso de se fazer seleção ao nascimento (USP – Biotério, 2003).

De acordo com Speakman (2007) existe um aparente limite na quantidade de alimento que um camundongo consegue ingerir durante a lactação e, portanto, um limite na quantidade de leite que pode ser produzido. Com o aumento do tamanho da ninhada, esse limite deve ser dividido entre mais animais com a consequência de filhotes menores ao desmame. E presumindo-se que existe um tamanho mínimo ao desmame para que haja sobrevivência do animal, existe um limite de animais por ninhada para que ocorra o sucesso reprodutivo, a depender da linhagem.

Caso haja necessidade um filhote pode ser retirado de sua mãe e colocado junto a outra fêmea em lactação. Frequentemente a nova mãe aceita e cria o animal normalmente, provavelmente essa aceitação vem do fato de a espécie possuir ninhos comunitários onde as fêmeas se revezam no cuidado dos filhotes e até os machos participam da criação das ninhadas (Wasson, 2017).

A partir do 15º dia os filhotes começam a se alimentar de ração que a mãe traz para o interior da gaiola. O desmame pode ocorrer a partir dos 18 dias, dependendo da linhagem. Em alguns casos, dado o pequeno tamanho do filhote (principalmente em linhagens consanguíneas) o desmame se dá com 4 semanas de idade. No ato do desmame, os animais são sexados e pesados. O peso médio aos 21 dias situa-se, em torno de 10-12 g, para camundongos *outbred* e 8-10 g, para camundongos *inbred*. (Andrade et al., 2002) Figura 5. Vale ressaltar que a literatura revisada não menciona nenhum cuidado específico para os filhotes após o desmame, o que implica dizer que os cuidados de manejo citados acima são suficientes para a manutenção adequada dos mesmos.

Antes do desmame, Lecker & Froberg-Fejko (2016) cita a importância de proteger os filhotes da desidratação e de mudanças de temperatura, já que estes ainda não possuem sistema de termorregulação eficiente, com o uso de tocas e de materiais de ninho. É também importante manter um fornecimento maior de alimento durante a lactação, já que a quantidade de recursos disponíveis influencia o esforço parental durante todo o período da cria, e evitar manejos desnecessários para evitar o estresse dos animais que, quando muito estressados, podem cometer canibalismo dos filhotes.

6. Estratégias de melhoria na reprodução de camundongos em biotério

Vários aspectos são essenciais à manutenção dos animais de biotério considerando seu bem-estar. Entre eles devemos estar atentos principalmente a: espaço adequado, limpeza, nutrição, manuseio, barulho, e enriquecimento ambiental. Lembrando que no contexto da reprodução dos animais em biotério, este bem-estar é fundamental para se obter ninhadas saudáveis.

É importante ressaltar a necessidade de manter o ambiente dos animais limpos de maneira a impedir possíveis contaminações cruzadas, além de realizar exames de fezes periódicos e manter a observação dos animais para detectar possíveis doenças que podem não apenas diminuir o sucesso reprodutivo como também eliminar linhagens de um biotério.

O manuseio excessivo dos animais pode gerar estresse (Lecker & Froberg-Fejko, 2016), uma causa importante de queda na performance reprodutiva e no cuidado parental. Assim, é importante evitar manipulações desnecessárias principalmente em primíparas. Evitar distúrbios sonoros como barulhos altos também é necessário.

O ambiente é um fator influente na reprodução. O uso de tocas na gaiola ajuda a proteger a ninhada do frio e da desidratação. Foi observado por Lecker & Froberg-Fejko (2016) uma maior taxa de animais desmamados em gaiolas com tocas, valendo lembrar que o uso de tocas vermelhas transparentes permite a observação dos animais enquanto eles ainda se sentem seguros, já que a retina deles não é sensível à cor vermelha e eles sentem que estão em ambiente escuro.

O mesmo trabalho menciona o uso de materiais, como papel, para construção de ninhos, favorecendo a termorregulação tanto das mães quanto dos filhotes, além de permitir que os animais apresentem seu comportamento natural, o que reduz o estresse e aumenta o sucesso reprodutivo. Murray & Parker (2005) também relaciona problemas reprodutivos com a temperatura ambiente, barulhos e outros fatores que geram estresse nos animais.

Um outro aspecto importante é a alimentação materna. Durante o experimento realizado por Dusíek et al. (2017), foi observado que o efeito da restrição alimentar antes da reprodução se estendeu durante a gestação e lactação mesmo quando as fêmeas receberam alimentação *ad libitum* posteriormente. Foi percebida uma conexão positiva entre um maior peso dos filhotes no desmame e o aumento de peso materno durante a lactação, o que aconteceu mais no grupo de fêmeas cuja alimentação foi previamente restringida, o mesmo grupo investiu mais esforço parental indicado por uma ninhada maior no nascimento e desmame, sem correlação com o peso da mãe no momento do acasalamento. O grupo concluiu que a restrição alimentar antes do acasalamento aumentou a sobrevivência da ninhada e estimulou um comportamento parental mais efetivo, já que houve uma redução seletiva da ninhada e filhotes menores no momento do nascimento o que diminuiu o custo reprodutivo.

Quando estamos tratando de alimentos, a quantidade de recursos disponíveis influencia o cuidado parental, quanto mais recursos, maior é o esforço empregado pelas fêmeas na criação da ninhada. Quando existe falta destes os pais podem investir mais naqueles que tem maiores chance de sobrevivência. A rivalidade entre os irmãos também aumenta conforme os recursos diminuem durante o período da lactação, diminuindo o tamanho da ninhada como consequência (Dusíek et al., 2017).

Além disso, Lecker & Froberg-Fejko (2016) faz uma observação sobre a importância da nutrição pós-parto para controle de canibalismo, utilizar petiscos de maneira e permitir que a mãe interaja com o ambiente para encontrar o alimento desestressa as fêmeas ao mesmo tempo em que um suporte nutricional adicional é oferecido a elas durante a fase de lactação. A oferta de alternativas alimentares é uma forma fácil de oferecer enriquecimento ambiental aos animais.

Existem diversos métodos que podem ser utilizados na reprodução de animais de biotério e no caso da reprodução não consanguínea é necessário um registro cuidadoso da parentalidade dos animais da colônia e existem softwares que auxiliam na escolha de pares adequados. De acordo com Lapchik et al. (2017) Os sistemas mais utilizados são: 1) o circular Poiley, onde a população é dividida

em grupos e o macho é transferido para o grupo vizinho; e 2) o Falconer, onde a colônia também é dividida em grupos, onde cada macho acasalado contribui com apenas um filhote macho e cada fêmea com um filhote fêmea onde um dos sexos é rotativo e o outro é fixo para o acasalamento da próxima geração (um dos sexos se mantém no mesmo grupo e o outro migra de grupo).

7. Ética no uso animal

O uso de animais na experimentação animal, apesar de ser criticado por parte da sociedade, ainda é necessário. Ao utilizarmos esses estamos seguindo normas e regulamentos que protegem consumidores de medicamentos, técnicas e procedimentos médicos. Para determinar a segurança desses para seres humanos é necessário testá-los em animais primeiro, é ilegal e antiético o teste em humanos sem que antes testes em outras espécies tenham acontecido.

No entanto, o uso de animais de pesquisas deve sempre ser feito seguindo princípios éticos. A ética no uso de animais em experimentos é amplamente discutida e revisada por pesquisadores e pela sociedade que são afetados pelo sofrimento infligido em seres por quem se tem carinho e cuidado. Em meados do século 20 essa discussão gerou cinco pré-requisitos para o uso de animais que foram pensados por cientistas preocupados com o bem estar de cobaias: 1) O uso é justificado apenas em casos de questões científicas reais; 2) Analgesia e Anestesia devem ser administradas sempre que possível; 3) A dor, o sofrimento e a lesão, além do número de espécimes utilizados devem ser minimizados ao máximo; 4) A experimentação deve ser conduzida apenas por pessoas experientes; e 5) É preferido o uso de animais de espécies cujo sistema nervoso é mais simples, menos sensíveis a dor (Hedrich & Bullock, 2004).

Um marco deste debate ético foi a publicação, em 1959, do livro “The Principles of Humane Experimental Technique” de William M. S. Russel e Rex L. Burch, no qual os autores estabeleceram o princípio dos 3 Rs, onde eles sintetizaram o princípio humanitário da experimentação e os cinco pré-requisitos discutidos anteriormente. Esse princípio consiste em três palavras, que em inglês começam com ‘R’: Substituir (Replace), Reduzir (Reduce) e Refinar (Refine). Esse princípio propõe que os animais sejam substituídos por modelos alternativos não animais quando possível, que cada experimento use o menor número possível de animais e que as técnicas e procedimentos utilizados neles sejam refinados (Neves et al., 2013).

Com o tempo os países criaram leis que regulamentam o uso de animais baseadas nos 3 Rs e hoje existem normas nacionais e internacionais que regulam a experimentação animal, sendo que no Brasil a lei para uso de animais em experimentação foi sancionada em 2008 (Lei nº11.794, 8 de outubro de 2008). Uma dessas normas é a submissão de projetos que irão utilizar animais à Comissão de Ética em Uso Animal da Instituição onde o projeto será realizado. A comissão então analisa a necessidade e verifica se o projeto está em acordo com os protocolos, princípios e leis de experimentação, emite um parecer que aprova ou não os protocolos, permitindo ou não a compra dos animais e a realização do projeto (Neves et al., 2013). Hoje ainda existe a obrigatoriedade de capacitação do pessoal envolvido em atividades de ensino e pesquisa que utilizam animais (RESOLUÇÃO CONCEA/MCTI Nº 49, de 07 de maio de 2021).

No Brasil existe um órgão integrante do Ministério da Ciência e Tecnologia - o CONCEA, que possui competência para criar normas relativas ao uso de animais em pesquisa, estabelecer protocolos para centros de criação, biotérios e laboratórios que usem os animais e o credenciamento de instituições que utilizam esses.

7.1. Alternativas ao Uso Animal

Felizmente cada vez mais recursos alternativos estão disponíveis para o uso em pesquisa. Graças a inovações científicas é cada vez menos necessário o uso de animais em pesquisas de toxicidade, neurociência e desenvolvimento de drogas.

Uma destas alternativas é o uso de métodos *in vitro*, que é utilizado em testes preliminares de novas drogas e estudos de toxicidade. Isso diminui a quantidade de animais utilizados em etapas posteriores e torna o experimento mais reprodutível por aumentar o seu controle além de ser uma técnica confiável e amplamente aceita na comunidade científica (RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA Nº 30).

Outra opção é o uso de softwares de computador que são utilizados para prever possíveis efeitos tóxicos e biológicos de novas drogas através de simulações. Essas simulações reduzem o número de moléculas que vão para etapas futuras em experimentos *in vivo* (Doke & Dhawale, 2013).

Apesar dos avanços nos métodos alternativos, devido à complexidade do organismo dos mamíferos, ainda não é possível a substituição do uso de animais em pesquisa científica e em algumas áreas, como na produção de medicamentos veterinários onde estes nunca poderão ser substituídos (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório).

8. Considerações Finais

Animais são usados em pesquisas fundamentais para a saúde humana e animal, auxiliando na produção de medicamentos e técnicas inovadoras que trazem bem-estar e qualidade de vida tanto para humanos quanto para animais.

Hoje a substituição destes na pesquisa ainda não é possível, portanto devemos trabalhar para que não haja sofrimento e estresse desnecessário para eles durante a sua produção e uso em experimentação. Para tal acredito que priorizar o conhecimento reprodutivo e comportamental natural é necessário. Deste modo podemos criar um ambiente em que são criados animais saudáveis e sadios para suprir a demanda atual de pesquisadores ao mesmo tempo em que trabalhamos de acordo com a ética.

Podemos concluir então que o uso de animais em pesquisa é fundamental e por isso a produção de animais em biotérios e conhecer seus processos reprodutivos é importante para esse processo.

Referências Bibliográficas

ALLEN et al. Rat Breeding Parameters According to Floor Space Available in Cage; J Am Assoc Lab Anim Sci. v. 55, n.1, p. 21–24, 2016.

ANDRADE et al. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6.

CHORILLI et al. Animais de laboratório: o camundongo. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 28, n.1, p.11-23, 2007.

CONCEA. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório; Disponível em: http://www.sbcal.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=41 Acesso em: 22 de abril de 2021

DOKE S.K. & DHAWALE S.C. Alternatives to animal testing: A review. Saudi Pharm J. v. 23, n.3, p. 223-9, 2015.

DUSŤEK et al. Pre-breeding food restriction promotes the optimization of parental investment in house mice, *Mus musculus*; PLoS ONE, v. 12, n.5, e0178804, 2017

Entenda o que é bem estar animal. World Animal Protection, 18 de Agosto de 2016. Disponível em: <https://www.worldanimalprotection.org.br/blogs/entenda-o-que-e-bem-estar-animal> . Acesso em: 22 de abril de 2021

FAHEY et al. The case for genetic monitoring of mice and rats used in biomedical research. Mamm Genome. v. 24, n.3, p. 89–94, 2013.

FONTES R.S. & SANTOS R.A. Seção de Produção de Animais Specified Pathogen Free (SPF). In: NEVES; et al. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP, 2013.

FOX et al. THE MOUSE IN BIOMEDICAL RESEARCH, 2ND EDITION; Elsevier; 2007.

HEDRICH H.J. & BULLOCK G.; The Laboratory Mouse; Elsevier; 2004.

HICKMAN et al. Commonly Used Animal Models *in* SUCKOW et al: Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students; United States of America: Elsevier, 2017; p117-175.

LAPCHIK et al. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório; Atheneu; 2017.

LECKER J. & FROBERG-FEJKO K. Using environmental enrichment and nutritional supplementation to improve breeding success in rodents. Lab Animal. V. 45, n.10, p. 406-407, 2016

MURRAY K.A. & PARKER N.J. Breeding genetically modified rodents: tips for tracking and troubleshooting reproductive performance. *Lab Animal*. v.34, n.4, p. 36-41, 2005.

NEVES et al, *Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratórios do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP*; Brasil; 2013.

National Research Council. *Guide for care and use of laboratory animals*. 8th ed. Washington: The National Academies Press; 2011. 248p. Disponível em: <http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf> Acesso em: 05/05/2021

RAPPUOLI R., 2014. Inner workings: 1885, the first rabies vaccination in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 12273.

RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA Nº 15, de 16 de dezembro 2013

RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA Nº 30, de 2 de fevereiro de 2016

RESOLUÇÃO CONCEA/MCTI Nº 49, de 07 de maio de 2021

Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório Disponível em: <https://www.sbcal.org.br/> Acesso em: 11/05/2021

SPEAKMAN J.R. The energy cost of reproduction in small rodents (Aberdeen Centre for Energy Regulation and Obesity (ACERO), School of Biological Sciences, University of Aberdeen, Scotland, ,2007; *Theriologica Sinica*

USP – Biotério; *Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório*, 2003 Institute of Laboratory Animal Resources; Disponível em: http://www.usp.br/bioterio/Artigos/Taxonomia_e_biologia.pdf Acesso em: 05/05/2021

WASSON K. Retrospective Analysis of Reproductive Performance of Pair-bred Compared with Trio-bred Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. v. 56, n. 2, p. 190-193, 2017.