

# AVALIAÇÃO E INTERVENÇÃO CLÍNICA EM MODELO MURINO

---

*Data de aceite: 03/07/2023*

### **Monique Ribeiro de Lima**

Centro de Experimentação Animal,  
Instituto Oswaldo Cruz, Fundação  
Oswaldo Cruz,  
Rio de Janeiro/RJ  
ORCID 0009-0008-8745-9522

## **1 | INTRODUÇÃO**

Os animais desempenham um papel fundamental como modelos para as pesquisas biomédicas, além da compreensão e descobertas de tratamentos para uma ampla gama de doenças humanas e animais. Os animais também são importantes na determinação da eficácia e segurança de vacinas, medicamentos, produtos de consumo e muitas outras substâncias. No entanto, o bem-estar dos animais usados nos testes pode ser afetado negativamente pela dor e o desconforto resultantes da indução de doenças ou toxicidade. As normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) determinam que as dores devem ser evitadas ou, se inevitáveis, devem ser

limitadas apenas ao necessário para atingir os objetivos do estudo.

Apesar de ser o primeiro passo para o entendimento das doenças, o experimento *in vivo* é o principal elo entre os estudos *in vitro* e os ensaios clínicos em humanos, e todos os indivíduos que utilizam animais para atingir os objetivos científicos e experimentais têm responsabilidades ética e legal em minimizar a dor e/ou desconforto animal.

O ponto final humanitário ou *humane endpoints* pode ser definido como o primeiro indicador de dor e/ou desconforto no animal experimental e pode ser implementado com base nas diretrizes éticas e científicas para restringir ou encerrar a dor e o desconforto por meio de ações específicas. Entre as estratégias práticas para minimizar ou evitar a dor e o desconforto, incluem-se o uso de medicamentos, cuidados veterinários, aclimação e consideração de alternativas de substituição e redução. A consideração e o uso apropriado dessas práticas podem ajudar a manutenção do bem-estar ideal

para animais usados em pesquisas e testes biomédicos.

Os pontos finais humanitários são pontos de corte nos quais o experimento ou o uso de um determinado animal deve ser interrompido para evitar dor ou desconforto. Eles podem ser de dois tipos: relacionados à gravidade e relacionados aos objetivos. Os primeiros são voltados ao modo como um animal pode estar fisiologicamente afetado a ponto de não fornecer dados científicos confiáveis, ou quando o grau de sofrimento vai além do provável benefício do estudo ou é eticamente inaceitável. O ponto final relacionado aos objetivos surge quando o propósito de um experimento foi alcançado ou é inatingível, de modo que a perturbação envolvida na continuação, por menor que seja, é desnecessária (MORTON, 1999).

Para Linda Toth (2018), deve haver pelo menos duas considerações para selecionar os pontos finais humanitários apropriados para qualquer experimento. Primeiro, o propósito científico do experimento deve ser claramente compreendido e bem justificado, e o segundo recurso-chave para selecionar o ponto final ideal é a prevenção ou minimização de danos aos animais.

A definição dos pontos finais humanitários deve fazer parte de todos os protocolos experimentais enviados para a apreciação das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) e deve abordar os pontos específicos para cada protocolo. É ideal que os objetivos científicos e os objetivos do estudo possam ser alcançados sem efeitos adversos, dor ou distresse. A prevenção de dor e distresse requerem conhecimento do comportamento normal da espécie em questão e dos efeitos adversos esperados.

Embora todos os estudos devam empregar pontos finais humanitários, os estudos que geralmente requerem consideração especial incluem aqueles que envolvem modelos de tumor, doenças infecciosas, desafio de vacina, modelagem de dor, trauma, produção de anticorpos monoclonais, avaliação de efeitos toxicológicos, falência de órgãos ou sistemas e modelos de choque cardiovascular (ILAR, 2014).

Muitas abordagens foram desenvolvidas para facilitar a avaliação da condição física dos animais experimentais. Algumas estratégias se concentram na avaliação do bem-estar animal com referência a listas completas de sinais clínicos que podem refletir dor, distresse ou morbidade. Os sinais clínicos e comportamentais podem certamente indicar doença, e muitos provavelmente denotam dor ou desconforto. No entanto, muitos sinais clínicos considerados críticos podem não sinalizar morte iminente. Assim, alguns sinais podem indicar doença ou distresse, mas não são particularmente úteis para prever a morte do animal (TOTH, 1997).

O emprego de folhas de pontuação (*checklists*), nas quais uma série de efeitos adversos potenciais podem ser pontuados por gravidade, e a pontuação acumulada é avaliada com uma frequência adequada, pode ser uma ajuda útil para identificar animais com dor ou desconforto e, também, ajudar na avaliação da gravidade do procedimento. Os pontos finais humanitários podem ser construídos de antemão com base em prováveis

efeitos adversos, ou a partir de informações coletadas em estudos-piloto, mas devem ser atualizados à medida que o experimento avança para refletir os efeitos adversos observados (MORTON E GRIFFITHS, 1985).

Para Hendriksen e colaboradores (2011), a finalização humanitária pode ser entendida como uma estratégia de refinamento projetada para minimizar a dor ou desconforto experimentados por animais durante um ensaio experimental. Como tal, esse conceito representa um importante mecanismo para a aplicação dos 3R's, e a literatura publicada ao longo dos últimos anos ilustra como o uso eficaz das finalizações humanitárias desenvolveu-se juntamente com outros procedimentos de refinamento, em resposta aos esforços para melhoria do bem-estar animal. Essa descrição reflete o progresso dos últimos anos na tentativa de prevenir o sofrimento evitável de animais de laboratório, através do reconhecimento de desfechos mais humanos como um componente fundamental na aplicação dos princípios dos 3R's.

## 2 | COMPORTAMENTO NATURAL

O conhecimento do comportamento natural das espécies fornece informações úteis para avaliar seu bem-estar, e a maneira como um animal de laboratório pode se envolver em seu repertório comportamental natural determina, em grande medida, o seu estado de bem-estar. Durante o período de aclimação, os pesquisadores devem se familiarizar com o comportamento normal de um animal específico ou grupo de animais na situação da pesquisa. Níveis normais de padrões fisiológicos como frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura corpórea e marcadores bioquímicos ou hormonais podem também ser estabelecidos durante este período (BRASIL, 2015).

Os sinais clínicos (por definição, aqueles observáveis) fornecem potencialmente um objetivo, em vez de um julgamento subjetivo da dor e distresse do animal. No entanto, para que tais sinais sejam representativos, os observadores devem ter boa capacidade de observação, conhecimento do que é normal para aquele animal individual, linhagem e espécie e boas habilidades clínicas. Idealmente, deve-se ter uma atitude empática e a melhor estratégia para avaliação é envolver todos os que estão no trabalho de pesquisa, onde cada membro trará um enfoque diferente. Para Morton (2000), os cuidadores “conhecem” seus animais e suas particularidades, os veterinários possuem habilidades clínicas e os pesquisadores reconhecem os efeitos colaterais potenciais de seus procedimentos científicos, levando a um melhor ajuizamento das observações.

A capacidade atual de criar camundongos geneticamente modificados altamente sofisticados, inserindo-se transgenes ou mutações direcionadas em genes endógenos, tornou o camundongo de laboratório o animal experimental mais amplamente utilizado, ampliando o número de linhagens disponíveis. Consequentemente, há uma grande diversidade de características comportamentais e de valores fisiológicos.

O padrão comportamental de um camundongo (*Mus musculus*) de laboratório é determinado, em grande parte, pelas oportunidades oferecidas pelo ambiente. O alojamento deve, idealmente, ser baseado na criação de condições que ofereçam a maior variedade possível de atividades naturais, como exploração, descanso, escalada, higiene, forrageamento, nidificação e comportamento social. Para esse fim, é importante a implementação de um programa de Enriquecimento Ambiental como um compromisso entre as necessidades do animal e o que é viável em um ambiente de laboratório. De modo geral, um camundongo de laboratório saudável é alerta, curioso, envolve-se em interações sociais, possui aparência saudável, limpo e ativo (SIROIS, 2007).

Os camundongos possuem uma área de superfície relativamente grande por grama de peso corporal, o que os torna sensíveis a grandes flutuações na temperatura ambiente. Devido a essa grande proporção de superfície evaporativa para massa corporal, o camundongo tem uma sensibilidade maior à perda de água do que a maioria dos mamíferos. A ingestão diária de alimentos do camundongo é de cerca de 15g por 100g de peso corporal e de líquidos é de cerca de 15mL por 100g de peso corporal. Devido à sua relação superfície/volume desfavorável e sua alta taxa metabólica, os camundongos são extremamente sensíveis à perda de fluido/desidratação (JACOBY *et al.*, 2002, BAUMANS, 2006). Além disso, são animais noturnos e quase não têm percepção de cores, sendo sensíveis à luz de alta intensidade, especialmente em albinos, e são capazes de ouvir sons fora da faixa de frequência audível para humanos (ultrassom) (HEFFNER; HEFFNER, 2007).

A construção de ninhos é comum em espécies de roedores. Camundongos selvagens constroem ninhos para fornecer calor, abrigo contra predadores e competidores e para permitir uma reprodução bem-sucedida. A construção de ninhos aumenta o sucesso reprodutivo ao longo da vida, sendo uma adaptação termorreguladora essencial (HESS *et al.*, 2008).

O rato de laboratório (*Rattus norvegicus*) possui comportamento exploratório para orientação em seu ambiente; são animais noturnos e sociais. A habitação individual pode levar ao tédio e potencialmente resultar em comportamento estereotipado. Cerca de 40% do tempo de um rato é gasto mantendo a pelagem e o corpo limpos, geralmente depois de se alimentar, beber ou explorar. A diminuição do asseio rapidamente se torna aparente e pode ser vista ao redor do ânus e na forma de uma secreção marrom-avermelhada ao redor do olho (cromodacriorreia) produzida pela glândula Harder. Os ratos são capazes de reconhecer humanos individualmente e, conseqüentemente, é importante que eles estejam familiarizados com as pessoas que os manipulam e os alimentam (ANDERSEN, 2004). Também são sensíveis a grandes flutuações de umidade e frequência de ventilação; ou seja, problemas respiratórios e constrição em anel da cauda<sup>1</sup> estão associados a umidade

---

1 A cauda anelada é uma condição patológica de roedores de laboratório caracterizada por constrições anulares que afetam a cauda e, menos frequentemente, os membros posteriores, levando a necrose distal e, eventualmente, auto-

relativa alta e baixa, respectivamente. De modo geral, o rato de laboratório saudável é alerta, curioso, interativo, limpo e ativo. Os ratos jovens são mais ativos que os animais mais velhos e as fêmeas são geralmente mais ativas que os machos.

Os ratos, assim como os camundongos, possuem hábitos noturnos, período no qual se alimentam e apresentam maior atividade. Adaptam-se bem em diversas condições e preferem ambientes que lhes permitam explorar e escalar. A mastigação constante é importante para evitar o crescimento dos seus incisivos, que é contínuo (LAPCHIK *et al.*, 2009; SIROIS, 2007).

### 3 | PARÂMETROS OBSERVÁVEIS: CLÍNICO-COMPORTAMENTAL

Levar em consideração o comportamento de um animal nas condições em que está sendo mantido é indiscutivelmente tão importante - se não mais - quanto avaliações bioquímicas e fisiológicas, como glicemia, concentrações de creatinina e assim por diante. Animais que são mal socializados ou alojados inadequadamente quando jovens podem desenvolver padrões comportamentais anormais que se tornam aceitos como normais. Embora a literatura seja uma fonte valiosa de informações sobre o que é natural, não há substituto para a observação direta dos animais e a orientação de uma equipe especializada em cuidados com animais.

Embora seja difícil observar comportamentos e reconhecer a dor nos animais ou monitorar animais individuais (por exemplo, ingestão alimentar ou produção fecal e urinária) quando alojados em grupos, é possível observar seu comportamento, postura e aparência e interações um com o outro; por exemplo, eles podem se afastar de outros indivíduos do seu grupo social.

Comportamentos que podem ser observados facilmente de maneira não invasiva podem fornecer pistas sensíveis quanto às alterações fisiológicas de um animal em comparação com as ferramentas clássicas de monitoramento clínico (mensuração e temperatura, peso, frequências cardíacas e respiratórias). Observações na gaiola são especialmente vantajosas, pois impõem estresse mínimo ao animal e reduzem efeitos indesejados, como estresse por novidade ou outras alterações fisiológicas e comportamentais que podem ser causadas pelo ambiente desconhecido de um equipamento, por exemplo.

Os tipos de sinais e condições clínicas que podem ser observados variam desde os mensuráveis (paramétricos) até os de natureza qualitativa (não paramétricos). No entanto, ambos os tipos são de grande importância para a avaliação do bem-estar animal. Por exemplo, o peso corporal pode ser mensurado, enquanto a aparência de um animal com pelagem eriçada ou postura encurvada pode ser registrada como presente ou ausente (MORTON, 2000). A atividade, postura corporal, agressividade, resposta ao manuseio,

---

-amputação espontânea. Umidade ambiental inferior a 20% pode resultar na constrição em anel da cauda em ratos jovens (BAKER; LINDSEY; WEISBROTH, 1979).

vocalização, *grooming* e estereotípias são exemplos de parâmetros clínico-comportamentais que podem ser avaliados.

#### a. Expressões faciais

A percepção da dor varia entre os indivíduos, mas pode ser demonstrada de várias formas em diferentes espécies animais. Nesse contexto, as expressões faciais são um exemplo de demonstração de dor que pode ser empregado para avaliação do ponto final humanitário. A aplicação das escalas de caretas na ciência de animais de laboratório visa proporcionar a possibilidade de classificar intervenções e tratamentos específicos e garantir um melhor atendimento veterinário aos animais por meio da avaliação direta da condição de dor.

A pesquisa de Jeffrey Mogil e sua equipe demonstrou que as mudanças na expressão facial fornecem um meio confiável e rápido de avaliar a dor em camundongos e ratos. As ‘escalas de careta’ (*The Mouse Grimace Scale – MGS* e *The Rat Grimace Scale - MRS*) foram desenvolvidas inicialmente para ratos e camundongos, com base em mudanças faciais, como o estreitamento/fechamento dos olhos, protuberâncias nasais e de bochechas, posicionamento das orelhas e mudanças na posição e forma das vibrissas. Esses critérios são pontuados pelos observadores e classificados em graus de desvios em função do agravamento da condição de dor. As expressões faciais são pontuadas em uma escala de 0 a 2 por sua evidência em fotografias tiradas de gravações de vídeo digital. Uma pontuação de “0” indica que determinada expressão está ausente; pontuação “1” indica que determinada expressão é moderada e a pontuação de “2” indica que determinada expressão é evidente (escalas demonstradas no item 11 deste capítulo) (LANGFORD *et al.*, 2010; SOTOCINAL *et al.*, 2011).

A escala foi originalmente desenvolvida para identificar a dor aguda a partir das expressões faciais de camundongos, no entanto, a careta também pode ser induzida por outros fatores de estresse. Para avaliação da escala, os animais podem ser filmados e as fotos do vídeo classificadas e pontuadas manualmente. A avaliação também pode ser realizada ao vivo, em tempo real, por um examinador humano ou por captura de imagens individuais em caixas personalizadas para fotos. Langford e colaboradores (2010) demonstraram que o nível de experiência entre os observadores no uso da escala pode ter influência na precisão da técnica, determinada em 97% e 81% de confiança para pontuadores experientes e inexperientes, respectivamente. Portanto, tal avaliação requer adaptação do animal à condição experimental, e o observador precisa de treinamento e experiência para reconhecer e categorizar as expressões faciais.

Outras escalas de avaliações relacionadas ao fechamento dos olhos podem ser empregadas para avaliação do ponto final humanitário. Alguns estudos usam o percentual de abertura dos olhos como escore individual ou empregado juntamente com outros

parâmetros observacionais. Nunamaker e colaboradores (2013) empregaram a pontuação de 0 a 3 na avaliação dos olhos, onde 0 = olhos com mais de 75% de abertura; 1 = olhos com abertura de 50% a 75%; 2 = olhos abertos em 25% a 49%; e 3 = olhos com menos de 25% abertura, e quanto mais fechados estão os olhos, maior é a dor e o desconforto experimentados pelos animais (Figura 1).

#### b. Condição postural

Outro parâmetro simples de avaliar é a alteração de postura. Animais com fortes dores abdominais tendem a arquear o dorso quanto maior o grau de dor experimentado. A postura pode ser pontuada com base em uma aparência encurvada, podendo variar de zero a 3, isto é, da postura corporal normal; levemente curvada; moderadamente curvada e gravemente curvada, respectivamente (NUNAMAKER *et al.*, 2013). A interpretação da postura curvada em roedores pode não ser um indicador confiável de dor devido ao fato de esses animais conseguirem encobrir sinais de dor leve, como parte de uma estratégia instintiva, visando evitar atrair a atenção de predadores. Com isso, o ocultamento dos sinais dificulta o monitoramento da dor.

#### c. Grooming

A dor não controlada também pode resultar em mudanças nos comportamentos normais, como higiene, consumo alimentar e hídrico e na reprodução (Figura 2). A diminuição generalizada do comportamento de *grooming* (higiene e asseio) pode ser evidenciada por uma pelagem áspera e suja, principalmente em mucosas nasais e regiões perianal e perioral. A falta de comportamento de higiene pode representar um efeito colateral fisiológico do envelhecimento, mas quando observados em animais jovens e adultos, esses sinais podem indicar algum desconforto, indicando a necessidade de atenção.

O *barbering* (*grooming* intenso) é um comportamento anormal que causa alopecia e comumente afeta várias linhagens de camundongos de laboratório. Em algumas linhagens, acredita-se que o puxão excessivo de pelos cause uma alopecia assimétrica principalmente no dorso e nos bigodes e, juntos, são chamados de barbeamento (REINHARDT, 2005). Para camundongos, os bigodes são uma importante fonte de informação sensorial, o que torna sua perda uma preocupação de bem-estar e uma fonte potencial de variação comportamental em dados de pesquisa. A alopecia induzida por barbeamento é um sinal potencial de comprometimento cerebral e pode indicar um ambiente estressante (Figura 3).

A aparência do pelo com piloereção, aspecto sujo ou emaranhado indica ausência de comportamento normal de higiene. Isso pode ser devido a uma situação estressante baseada em deficiência física (através do experimento) ou social. Nesse caso, a presença de mordidas, feridas ou comportamento agressivo pode indicar desequilíbrio social. Tal desequilíbrio pode ocorrer se um ou dois animais experimentais estiverem enfraquecidos,

resultando em uma mudança na hierarquia social. Portanto, recomenda-se que animais em experimento não sejam misturados com animais saudáveis durante o período do protocolo experimental.

#### d. Nidificação

O comportamento de nidificação é um importante fator evolutivo para a maioria dos roedores. Os camundongos constroem ninhos para abrigo contra predadores e competidores e como forma de compensar as mudanças nas temperaturas, fornecendo isolamento externo e criando um ambiente menos estressante. Além de ninhos maternos, construídos especificamente para reprodução, ambos os sexos constroem ninhos se fornecidos materiais adequados. Um ninho completo, com uma cúpula envolvendo o centro do ninho, permite que se crie um microambiente quente e escuro que pode ser até 10°C mais quente do que o restante do ambiente da gaiola (GASKILL *et al.*, 2013).

A construção de ninhos é um comportamento natural e mostrou ser um indicador de bem-estar para animais de laboratório. Uma redução no comportamento de nidificação pode sinalizar uma mudança no estado motivacional do animal e um bom desempenho parece ser indicador de bem-estar. A pontuação de complexidade do ninho pode ser implementada facilmente em qualquer instalação de animais de laboratório e pode ser aplicada na rotina diária para a detecção e avaliação de comprometimento após procedimento experimental.

A avaliação da nidificação é baseada no comportamento normal do animal realizado na gaiola e não requer aparelhos especiais ou instalações de alojamento específicas. O teste não causa estresse adicional aos animais, pois a construção de ninhos é uma forma específica e complexa de interação ativa com o meio ambiente. Fornecer material de ninho permite que os camundongos estruturem seu ambiente e ganhem mais controle sobre suas condições de vida.

Para Jirkof e colaboradores (2013), a pontuação de complexidade do ninho pode ser realizada da seguinte forma: escore 0 = material para ninho não manipulado; escore 1 = material levemente manipulado, mais de 80% do material para a construção do ninho intacto; escore 2 = material para ninho visivelmente manipulado, menos de 80% do material para a construção do ninho intacto; escore 3 = local de nidificação perceptível; menos de 80% do material para a construção do ninho intacto; escore 4 = ninho plano, paredes mais altas que os camundongos; e escore 5 = ninho complexo em forma de tigela, paredes mais altas que camundongos.

Uma ferramenta foi desenvolvida para uma avaliação simples capaz de identificar camundongos com bem-estar comprometido, o teste de tempo de integração ao ninho (TIN). Para realizá-lo, uma quantidade de material de nidificação é adicionada a uma gaiola de camundongo, e os comportamentos de nidificação que ocorrem imediatamente depois são observados. O teste TIN produz um resultado positivo quando um camundongo integra



o novo material de nidificação no local de nidificação principal em 10 minutos, e a falha em interagir com o material de aninhamento é definida como teste negativo, produzindo um resultado binário (ROCK *et. al*, 2014).

#### e. Distúrbios neurológicos

Os ambientes cativos geralmente reduzem a capacidade do animal de controlar e modificar seu ambiente, o que intrinsecamente pode ser estressante, e, em condições experimentais, esse controle pode ser drasticamente reduzido. O estresse pode levar a comportamentos anormais, conhecidos como estereotipias, devido a mudanças permanentes na fisiologia cerebral (GARNER, 2005). Comportamentos estereotipados e outros comportamentos repetitivos podem sugerir frustração motivacional ou disfunção cerebral e devem ser considerados como possíveis sinais de alteração no bem-estar animal, embora outros fatores também devam ser considerados.

Em camundongos de laboratório, as estereotipias incluem comportamentos como roer barras, pular de forma circular e girar. Comportamentos anormais, incluindo as estereotipias, são vistos com mais frequência na fase escura, quando os camundongos estão ativos. Esses comportamentos são mais comuns em algumas cepas do que em outras, e podem ter efeitos negativos na saúde e impactos nos resultados da pesquisa (GARNER, MASON, 2002).

Os distúrbios neurológicos compreendem uma variedade de condições que afetam o cérebro e o sistema nervoso, incluindo, entre outros, epilepsia e acidente vascular cerebral (AVC). Quando tais distúrbios são induzidos, geralmente ocorrem por meio do uso de várias técnicas experimentais, como manipulação genética, exposição química ou lesão cerebral. O estresse crônico pode prejudicar a função cerebral e levar a condições como depressão, inquietação e tremores. Da mesma forma, a exposição a substâncias tóxicas ou agentes infecciosos pode comprometer as células cerebrais e causar déficits neurológicos.

Em modelos de AVC em camundongos, uma escala neurológica é usada para avaliar as alterações comportamentais gerais e déficits motores focais, sensoriais e de equilíbrio (escala neurológica modificada de DiSimoni). Para a avaliação de déficits gerais, os animais são inicialmente analisados em bancada aberta, isto é, sem a manipulação do observador, e alguns aspectos são observados, como a reação a ruídos (pela posição das orelhas), aspectos dos olhos e atividade (apatia e letargia). A reação de postura e equilíbrio é realizada na mão do avaliador, que inclina a palma da mão levemente, e, durante o movimento de balanço, o animal deve usar seus membros para se estabilizar. Para a avaliação de déficits focais são considerados, dentre outros aspectos, a simetria corpórea; a marcha; escalada em ângulo de 45°; movimento circular (animal suspenso pela cauda); simetria de membro anterior (comportamento de segurar com as patas dianteiras); e movimento circulatório obrigatório (ato de empurrar o animal lateralmente) (DONATH *et*

*al.*, 2016).

Como alguns distúrbios neurológicos podem estar associados ao ambiente cativo pouco estimulante, e não somente à condição experimental, é importante o fornecimento de itens de enriquecimento ambiental para prevenir determinados comportamentos. Mesmo que o enriquecimento ambiental não possa reverter comportamentos estereotipados estabelecidos, o fornecimento dos itens pode levar a uma melhor validade e confiabilidade experimental.

## 4 | PARÂMETROS FISIOPATOLÓGICOS

### a. Peso e condição corporal

Dentre os parâmetros mensuráveis, o de maior importância clínica é o peso, que, à primeira vista, parece ser uma métrica fácil de avaliar de forma objetiva e pode fornecer informações importantes sobre o ponto final humanitário. No entanto, a interpretação da perda de peso corporal no contexto de avaliação do agravamento de uma condição constitui um desafio que precisa levar em conta que o apetite, a ingestão de alimentos e o desenvolvimento do peso corporal são regulados de forma complexa. A interpretação da perda de peso é ainda mais difícil pelo fato de ser um sinal para várias condições associadas, como a redução do apetite, alterações metabólicas, aumento de gasto energético, má absorção ou cronicidade de uma doença.

Alguns comitês internacionais de cuidado e uso de animais adotam a recomendação de considerar a eutanásia para animais que perderam de 15 a 20% do seu peso corporal basal. Em estudos de irradiação, o valor preditivo positivo de uma perda de peso de 15% ou 20% para morte foi de 93,0% ou 97,1%, respectivamente (NUNAMAKER *et al.*, 2013). No entanto, existem problemas práticos com a aferição do peso, que pode não fornecer uma medida precisa dos depósitos de gordura e da massa muscular, pois esta pode ser mascarada se a perda de peso for encoberta pelo crescimento de um tumor, aumento de órgãos ou acúmulo de líquido intraperitoneal.

Os pontos finais humanitários baseados em perda de peso rápida (ao longo de alguns dias) ou gradual em relação ao peso inicial são fáceis de adotar e são amplamente aplicados. No entanto, os parâmetros baseados no peso podem ser mascarados em modelos de doença aguda, como choque circulatório, devido ao rápido agravamento da condição do animal que pode preceder a perda de peso (NEMZEK *et al.*, 2004).

Para combater a incerteza na avaliação do peso corporal como parâmetro individual no ponto final humanitário, deve-se aplicar essa métrica em combinação com outros critérios clínicos adicionais, levando a um maior valor preditivo de morbidade ou mortalidade. Com isso, a decisão pela eutanásia não deve ser baseada apenas em uma porcentagem arbitrária de mudança de peso corporal, devendo sempre considerar outros parâmetros indicativos de dor e considerações específicas do modelo animal (MEI *et al.*, 2019).

Em muitos casos, a condição corporal pode ser analisada em detrimento da mensuração do peso corporal. A pontuação da condição corporal de roedores é um método não invasivo para avaliar o estado de saúde e estabelecer parâmetros para os animais, em que o peso corporal não é uma ferramenta viável de monitoramento, como em modelos de tumor, produção de ascite e gravidez, ou para animais jovens em crescimento. Os escores de condição corporal (ECC) variam de 1 (emagrecimento) a 5 (obesidade). As pontuações são determinadas por exame visual, realizado pela observação da quantidade de massa corporal que cobre as protuberâncias ósseas na região pélvica, e por meio da palpação realizada sobre os ossos sacroilíacos (ULLMAN-CULLERE; FOLTZ, 1999). Uma ECC 2 – subcondicionada ou inferior - requer avaliações complementares para que seja realizada a intervenção clínica necessária e estabelecimento do ponto final humanitário mais apropriado.

#### b. Desidratação

Em um animal hidratado, a pele pressionada no dorso retorna rapidamente à sua posição normal após ser solta (turgor cutâneo). Em um animal desidratado, a pele demora a voltar ao normal ou permanece esticada. A desidratação pode aparecer pela incapacidade do animal em deambular até a fonte alimentar/hídrica, pode também estar associada à doença em geral (perda excessiva de fluidos) ou ter uma causa mais específica, como obstrução do trato digestivo ou anormalidades na dentição. Todas as possibilidades precisam ser levadas em consideração na hora da avaliação clínica. Animais idosos, muito jovens, obesos ou magros podem apresentar respostas alteradas no teste de turgor cutâneo.

#### c. Frequências respiratórias e cardíacas

Outros parâmetros fisiológicos mensuráveis, como as frequências respiratórias e cardíacas, são importantes indicadores de avaliação em estudos de segurança e toxicológicos. A pletismografia é um método não invasivo mais utilizado para monitorar a função respiratória, porém em alguns equipamentos o animal precisa estar contido, o que pode ser estressante. Já o monitoramento da frequência respiratória pela observação dos movimentos respiratórios pode ser difícil devido à alta frequência basal dos camundongos (80–230 movimentos respiratórios por minuto) e oferece apenas um dado instantâneo que pode ser influenciado pela hora do dia e pelo observador.

Aumentos na frequência respiratória de 1,3 a 1,5 vezes foram empregados como referência objetiva para finalização humanitária em modelo de câncer de pulmão, sinalizando a necessidade de intervenção clínica ou eutanásia (WINN *et al.*, 2021).

A avaliação da condição pulmonar pode ser baseada nos sinais clínicos obtidos através de observações subjetivas como, por exemplo, dispneia, taquipneia, respiração

superficial ou abdominal. A taxa de respiração e profundidade não são fáceis de avaliar em camundongos sem equipamento especializado, no entanto, animais com a respiração superficial ou rápida podem ser um indicador de agravamento da condição clínica. Portanto, dificuldades respiratórias graves ou contínuas são fortes indicadores para aplicação de pontos finais humanitários (GRAF *et al.*, 2016).

Os impulsos dolorosos ascendentes levam à ativação hipotalâmica e ao aumento da atividade do sistema simpático-adrenérgico. Essa ativação resulta em efeitos cardiovasculares substanciais, como alterações na frequência cardíaca. A resposta de curto prazo da frequência cardíaca medida por telemetria tem sido descrita como um método para estudar as propriedades analgésicas de compostos farmacêuticos em um modelo de dor visceral em ratos, e o método de monitoramento contínuo da frequência cardíaca foi capaz de identificar sinais de dor de grau leve a moderado em camundongos, que não poderiam ser claramente detectados de outra forma em tempo real (ARRAS *et al.*, 2007).

#### d. Temperatura corporal

A hipotermia não transitória tem sido sugerida como um preditor potencialmente útil de morte em alguns modelos de infecção experimental. A hipotermia comumente se instala quando a doença atinge um estágio de agravamento, e a temperatura corporal ou o monitoramento telemétrico pode constituir um importante refinamento dos pontos finais humanitários, particularmente se pontuados com outros parâmetros clínicos (WARN *et al.*, 2003).

A temperatura corporal é um sinal vital objetivo e diminui ao longo do tempo de maneira dependente da gravidade em determinados modelos de doenças, sendo um preditor robusto de óbito iminente. Estudos demonstraram que as temperaturas central e superficial podem ser usadas para refinar o ponto final humanitário. Os valores de corte para eutanásia variam substancialmente entre os projetos e entre o método de aferição da temperatura (sonda retal, termômetro infravermelho, chips subcutâneos).

Os estudos envolvendo mensurações de temperatura central e superficial em camundongos demonstraram que a temperatura da superfície é, em média, 2,57°C, 3–4°C ou 2–3°C abaixo da temperatura central, dependendo do local da aferição e das contenções aplicadas (esterno, dorso sem contenção e dorso com contenção, respectivamente), e há moderada a forte correlação entre as temperaturas central e superficial durante a hipotermia (HANKENSON *et al.*, 2013).

Um fator importante que contribui para as diferenças de temperatura absoluta entre a temperatura central e a de superfície é a temperatura ambiente. Quanto mais baixa a temperatura ambiente, menor a temperatura da superfície do animal, enquanto as respostas termorreguladoras mantêm a temperatura central constante. Outro fator que contribui para divergências entre a temperatura central e superficial é o manuseio

do animal. Dispositivos de contenção podem elevar a temperatura corporal em segundos após a contenção de um camundongo, resultado da ativação do sistema nervoso simpático com aumento da termogênese e da vasoconstrição dos vasos da pele. Porém, ambos os métodos de aquisição de dados de temperatura (central e superficial) são adequados como fator preditivo de óbito. A termometria infravermelha pode servir como uma alternativa confiável em detrimento de sistemas baseados em transponders implantáveis (MEI *et al.*, 2018).

A diminuição da temperatura corporal de 4 a 6°C abaixo do normal foi correlacionada com o óbito iminente em diversos modelos de doenças. Estudos de camundongos infectados com bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *epidermidis*) indicaram que uma hipotermia de 34°C (4,5°C abaixo do normal) foi preditivo de mortalidade (SOOTHILL *et al.*, 1992), enquanto a temperatura de 3 a 4°C abaixo do normal (37,5°C) foi preditivo de morte em animais infectados com vírus influenza (WONG *et al.*, 1997).

A hipotermia pode ser um desfecho eficaz para doenças infecciosas agudas, particularmente quando as medições são feitas com maior frequência, sendo preditor de óbito em modelos de infecção experimental, mas são necessários estudos adicionais em modelos que não sejam em doenças infecciosas. Se a hipotermia for usada como ponto final humanitário, os valores de corte devem ser determinados para cada modelo quando a intenção for antever o óbito.

## 5 | PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES

A avaliação de proteínas de fase aguda (PFA), catecolaminas, corticosteroides e hormônios como insulina, glucagon e prolactina são importantes parâmetros bioquímicos que, em conjunto com os parâmetros comportamentais e patofisiológicos, podem ser utilizados como critérios de decisão para o ponto final humanitário. Esses parâmetros podem fornecer informações precoces valiosas sobre o progresso das mudanças fisiológicas, quando características hormonais, enzimáticas, imunológicas e hematológicas se desviam significativamente de uma faixa normal. Podem ser realizados em amostras de sangue, urina, saliva, fezes, líquido lacrimal e assim por diante.

Embora as catecolaminas e os corticosteroides possam ser úteis na avaliação da resposta fisiológica ao estresse em animais de laboratório, não são recomendados como um preditores únicos (LITTIN *et al.*, 2008). As catecolaminas podem aumentar a frequência cardíaca, a pressão arterial e a frequência respiratória, porém, essas respostas nem sempre são indicativas de dor ou distresse nos animais. No geral, embora as catecolaminas possam fornecer algumas informações sobre a resposta fisiológica ao estresse em camundongos, elas não devem ser usadas como um único preditor de ponto final humanitário, e outros indicadores de bem-estar do animal, como sinais clínicos, comportamentais e peso corporal devem ser usados em conjunto para determinar quando a intervenção clínica será

necessária.

As PFA são úteis na previsão de ponto final humanitário em camundongos, pois refletem a gravidade da condição do animal. Quando um animal é submetido a um procedimento estressante, como uma cirurgia ou exposição a uma substância tóxica, as PFA aumentam em resposta ao dano tecidual e à inflamação. Níveis altos de PFA podem ser indicativos de distresse ou dor e a eutanásia pode ser justificada. Várias PFA foram estudadas em camundongos como preditores de pontos finais humanitários, incluindo proteína C reativa (PCR), amiloide sérica A e haptoglobina (CRAY; ZAIAS; ALTMAN, 2009).

A regulação dos genes pode indicar sinais precoces de dor e/ou distresse nos animais experimentais. A seleção de um marcador molecular que permite identificar as alterações fisiológicas precoces indicativas de dor pode ser um preditor importante do ponto final humanitário. Ao selecionar um marcador molecular, os pesquisadores podem intervir e minimizar os danos aos animais antes do seu agravamento, porém, é importante considerar a especificidade e a sensibilidade do marcador. O marcador deve ser específico para o processo fisiológico em estudo e não deve ser afetado por fatores como estresse, dieta ou outras intervenções experimentais.

As novas tecnologias inovadoras, como transcriptômica e proteômica, permitem estudar o efeito dos compostos-teste no nível molecular, detectando alterações no genoma. Por exemplo, a carcinogênese induzida quimicamente pode estar associada à regulação de um agrupamento de genes específicos, e estes podem ser monitorados para fornecer uma indicação precoce da indução do tumor (HOWARD, NEVALAINEN, PERRETTA, 2016).

## 6 | USO E INTERPRETAÇÃO DE UM SISTEMA DE PONTUAÇÃO

Ao projetar um experimento, o pesquisador deve especificar claramente o resultado experimental que deseja alcançar e os critérios específicos que permitirão o reconhecimento de quando os resultados experimentais foram alcançados. Além disso, deve-se identificar quaisquer efeitos adversos potenciais e os momentos em que a dor ou o distresse podem ocorrer. Os potenciais efeitos adversos podem ser baseados em publicações, experiências prévias e comunicação com os demais colegas da área. Se estes não forem confiáveis ou faltarem evidências, uma abordagem antropomórfica crítica pode ser adotada; ou seja, avaliar qual o impacto do procedimento em um humano, deduzir os sinais e então ajustá-los à luz da biologia do modelo experimental (MORTON, 1999). Alguns sinais podem ser comuns a todos os animais, por exemplo, diminuição da atividade, redução de consumo alimentar e hídrico e assim por diante. Essa fase é importante para que se possa determinar os sinais clínicos e estabelecer critérios para o ponto final humanitário. As tecnologias não invasivas, incluindo imagem, avaliação comportamental ou monitoramento fisiológico (por exemplo, por biotelemetria), podem ser úteis para reconhecer quando os resultados experimentais foram alcançados (LITTIN, *et al.*, 2008).

Um bom planejamento do projeto é necessário para determinar uma classificação de gravidade prospectiva adequada e desenvolver critérios de monitoramento e avaliações observacionais apropriadas e pontos finais humanitários adaptados ao estudo. Um sistema de avaliação ideal deverá incluir avaliações simples e objetivas que possam ser aplicadas de forma consistente, sendo usadas para detectar o início da dor e para monitorar seu desenvolvimento. Um sistema único de avaliação não está disponível, devido à grande variação de comportamentos e respostas entre as diferentes espécies, linhagens e animais individuais e as especificidades dos procedimentos experimentais. O emprego de sistemas de avaliação personalizados específicos para os projetos pode contribuir para refinamentos em modelos animais experimentais. Assim, é importante listar as respostas comportamentais ou sinais clínicos possíveis ou observados, quantificando ou pontuando sempre que possível, permitindo a identificação do ponto final humanitário.

Antes da identificação dos parâmetros relevantes para a determinação do ponto final humanitário, alguns aspectos devem ser verificados, como: identificação e avaliação de potenciais efeitos adversos e validação dos pontos finais humanitários selecionados. Dependendo do experimento, os pontos finais idealmente devem satisfazer os seguintes critérios: fácil de monitorar; reprodutível; não trabalhoso; predição válida da progressão da doença; relevante (equivalente) e robusto (pouca variação); redução máxima da dor e desconforto (HENDRIKSEN E MORTON, 1999).

O desenvolvimento de um sistema de monitoramento deve ser direcionado para um animal individual e não para um grupo de animais experimentais. Além disso, o nível de dor ou desconforto experimentado por cada animal precisa ser relatado, podendo ser usadas as categorias leve, moderada ou grave. É importante salientar que o uso de medidas objetivas para avaliar o nível de dor ou distresse experimentados pelo animal durante o procedimento deve capturar quaisquer questões relacionadas ao bem-estar, esperadas e inesperadas, que ocorram durante o curso do projeto e quaisquer ações de refinamento que foram tomadas no momento. Muitos dos sistemas publicados defendem alguma forma de sistema de pontuação numérica e classificam os sinais clínicos de acordo com seu agravamento. Evidentemente, a experiência e o julgamento profissional permitirão uma melhor pontuação objetiva.

As fichas de pontuação devem ser cuidadosamente construídas em consulta com todos os envolvidos no cuidado dos animais, e devem ser reavaliadas e modificadas com base em observações realizadas durante um estudo-piloto, de modo a identificar ações que possam refinar o procedimento ou estabelecer desfechos precoces e, assim, permitir uma intervenção mais rápida.

Os sinais clínicos cardinais podem ser apresentados em função do tempo e, essencialmente, todos os sinais clínicos devem ser descritos de uma forma que reduza a variação na interpretação do observador, podendo ser apenas como presente (+) e ausente (-), por exemplo. Outra forma de avaliação pode ser desenvolvida através de

uma pontuação objetiva, atribuindo um peso para cada um dos sinais de desconforto em uma escala, variando do normal ao nível mais alto de agravamento. Desta forma, obtém-se uma pontuação total que indica a extensão do desvio da normalidade e pode ser usada para iniciar uma ação como, por exemplo, tratamento médico. Além disso, é importante definir o limite aceitável ou permissível para determinado experimento, por exemplo, uma pontuação máxima de sinais/comportamentos clínicos que não devem ser excedidos (HOWARD, NEVALAINEN, PERRETTA, 2016).

O uso de pontuações para critérios variáveis e diferentes entre si pode melhorar a acurácia de uma avaliação clínica-comportamental em animais. A ideia é que, ao atribuir uma pontuação para cada critério, é possível combinar várias informações para produzir uma medida resumida que seja mais representativa do estado geral do animal ou da gravidade de sua condição. Em muitos casos, as pontuações são usadas em escalas, em que cada pontuação corresponde a uma determinada categoria ou nível de gravidade. É importante garantir que cada critério tenha um peso apropriado em relação aos demais e que a combinação das pontuações forneça uma medida válida e confiável. Além disso, é importante considerar a relevância clínica de cada critério e como eles se relacionam com o protocolo experimental. Nas fichas numéricas, uma série de sinais clínicos, indicadores físicos e parâmetros comportamentais podem ser avaliados através de uma pontuação de acordo com sua gravidade aparente. Por exemplo, zero para não afetado, '1' para desvio leve, '2' para desvio moderado e '3' para desvio substancial. As pontuações são somadas e os resultados são usados para determinar a ação necessária, como analgesia, de acordo com as ações predeterminadas no projeto.

A frequência com que os animais afetados devem ser observados deve ser determinada para cada estudo, e o intervalo entre as observações dependerá do curso de tempo esperado ou conhecido da condição. Por exemplo, em alguns casos experimentais de infecções/toxicidade, observações muito mais frequentes (por exemplo, a cada hora) podem ser necessárias. Agendar o estudo para que o período crítico para os animais ocorra durante o horário normal de trabalho (quando as luzes estão acesas na sala dos animais) pode ajudar a garantir que as observações apropriadas sejam feitas (MORTON, TOWNSEND, 1995).

Qualquer que seja o sistema de registro escolhido, este deve ser adaptado para estudos específicos e, em seguida, revisado e modificado regularmente com o uso, se necessário. Não se deve presumir que qualquer sistema de avaliação de bem-estar seja infalível. Sempre existe a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos inesperados, ou de um avaliador mais experiente detectar sinais clínicos muito sutis e não reconhecidos anteriormente. O equilíbrio é essencial entre a busca pela objetividade na avaliação do bem-estar, por um lado, e a confiança no julgamento de indivíduos experientes, por outro.



## 7 | VALIDAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE UM SISTEMA DE PONTUAÇÃO

Evitar ou minimizar a dor na pesquisa com animais é uma obrigação de todos os pesquisadores, por razões morais ou éticas. A identificação e validação de parâmetros para identificação dos pontos finais humanitários devem ser consideradas, mas esse não é um processo fácil nem simples.

Os conceitos-chave do desenvolvimento de qualquer escala são validade e confiabilidade. A validação e o monitoramento são necessários para garantir uma previsibilidade robusta do ponto final humanitário sem interferência com os objetivos científicos. Em muitos estudos, a dor e o desconforto podem ser evitados pela identificação de critérios clínicos e comportamentais que ocorrem antes de qualquer agravamento da condição clínica do animal. As pessoas envolvidas no estabelecimento e validação de parâmetros em experimentos devem ser estimuladas a apresentar e publicar os dados, para apoiar os esforços de refinar continuamente as práticas de uso de animais que ocorrem na pesquisa biomédica.

Os estudos-piloto são inestimáveis para a determinação de pontos finais humanitários precoces em um pequeno grupo de animais. Estes são uma maneira eficaz de reduzir os impactos negativos, evitando dores e desconfortos desnecessários para um número maior de animais. Os estudos-piloto podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para lidar com a condição de agravamento da condição de saúde de um animal, e tais estratégias podem incluir o ajuste de dose, alterações no tamanho da amostra, identificação de efeitos adversos, inclusão de refinamentos como uso de analgésicos e modificações nos procedimentos ou alteração na duração da exposição do animal a determinado patógeno ou substâncias, a fim de minimizar os impactos negativos sobre os animais (NRC, 2008).

Dado o amplo escopo de procedimentos e objetivos da pesquisa com animais, nenhuma referência única pode documentar todos os pontos finais humanitários para cada protocolo de pesquisa. Portanto, devem ser realizados estudos para identificar os pontos finais humanitários apropriados para cada um. É necessário que os pesquisadores validem os pontos finais quanto à integridade, objetividade e reprodutibilidade do estudo. Uma boa comunicação entre pesquisadores, equipe veterinária, equipe de cuidados com animais e a CEUA é fundamental para garantir o melhor resultado, tanto para o bem-estar dos animais quanto para os objetivos do estudo nesses programas de pesquisa.

## 8 | MEDIDAS DE CUIDADO E SUPORTE

Quando um ponto final humano é alcançado, o experimento deve ser interrompido imediatamente para evitar um agravamento da condição fisiológica, podendo envolver a eutanásia do animal ou o fornecimento de tratamento médico adequado para aliviar a dor e o desconforto.

O uso de cuidados de suporte deve ser meticulosamente considerado, pois auxilia as necessidades físicas básicas de um animal para que ele possa responder plenamente a insultos externos. Exemplos incluem o fornecimento de um ambiente aquecido (calor suplementar ou temperaturas ambientais aumentadas); fluidos parenterais; suporte nutricional, como fontes nutricionais de alta qualidade e de fácil acesso e digestão; e alterações nas gaiolas, incluindo materiais de cama ou nidificação alternativos para conforto e regulação da temperatura e o fornecimento de locais para abrigo. O efeito potencial de fornecer cuidados de suporte não deve ser subestimado, e sua possível influência nos resultados experimentais deve ser avaliada criticamente, como é feito para intervenções farmacológicas.

As estratégias para o manejo da dor e do desconforto podem incluir considerações não farmacológicas, como as citadas acima, intervenções farmacológicas ou eutanásia. A estratégia escolhida varia conforme a espécie, os procedimentos realizados, a duração da ação necessária, a via de administração preferida, o grau e o tipo de analgesia necessária e a pesquisa realizada (HAWKINS *et al.*, 2011).

É importante lembrar que, além dos pontos de intervenção humana antecipados, pode haver resultados inesperados (por exemplo, doença não relacionada, falha nos sistemas de suporte à vida, efeitos adversos inesperados). Estes podem ou não estar relacionados ao procedimento científico específico e podem justificar intervenções antes que os objetivos científicos sejam alcançados. Os pesquisadores e toda equipe de monitoramento do bem-estar precisam ser qualificados, flexíveis e adaptáveis para garantir que os pontos de intervenção sejam aplicados nessas circunstâncias.

Intervenções adequadas, quando os principais sinais aparecem ou atingem um nível limiar, devem ser definidas no momento em que os indicadores são discutidos. Por exemplo, fluidoterapia pode ser iniciada assim que os sinais de desidratação aparecerem, ou uma intervenção para perda de peso pode ser feita com o fornecimento de alimentos ao nível do chão (de preferência úmidos) (Figura 4).

Dentre as principais intervenções, podemos destacar, entre outras: aumento da frequência de observação de animais; modificação das práticas de alojamento e manejo para melhorar o conforto dos animais; tratamento veterinário, incluindo analgesia e/ou terapia de suporte; modificação dos procedimentos experimentais para minimizar o desconforto; interrupção de curto prazo de procedimentos dolorosos/estressantes; término permanente de procedimentos dolorosos/estressantes, ou seja, remoção dos animais do estudo e eutanásia. Quando forem identificados indicadores de dor, os analgésicos devem ser administrados na dose e por vias apropriadas para o estudo e para a espécie, e se houver a necessidade de eutanásia, os métodos usados devem ser os mais apropriados.

À luz das evidências científicas atuais, o Conselho Canadense de Cuidados com Animais expandiu o reconhecimento do impacto dos procedimentos científicos prolongados ou repetitivos em animais individuais, por exemplo, isolamento social,

marcação para identificação ou ambiente pouco estimulante, denominados como 'pontos finais cumulativos' (CCAC, 2022). Os pontos finais cumulativos são os pontos em que os animais individuais devem ser considerados como tendo atingido o envolvimento máximo de sua vida em atividades científicas. Considera-se que um animal atingiu um ponto final cumulativo quando atingiu um limite em termos da quantidade total de impacto no bem-estar que experimentou (NUNAMAKER *et al.*, 2021). No ponto final cumulativo, entende-se que os animais não devem ser mantidos indefinidamente sem um propósito claro e um plano definido, e seu uso prospectivo deve ser revisado periodicamente, para garantir que não sejam mantidos desnecessariamente.

Assim, segundo Fenwick e Griffin (2013), dentro dos princípios dos 3R's, o refinamento deve ser priorizado sobre a redução: os animais não devem ser usados além de seus pontos finais cumulativos simplesmente para reduzir o número total de animais empregados, e o custo ou a conveniência não devem ser usados como justificativas ao decidir sobre parâmetros cumulativos.

## Figuras

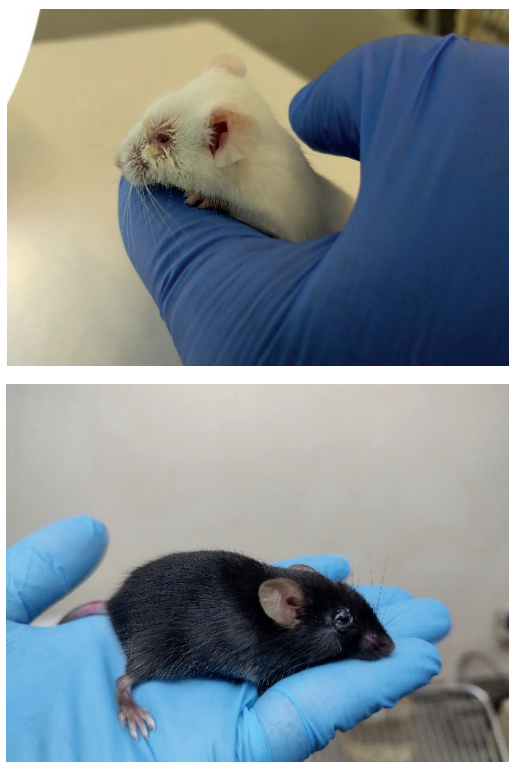


Figura 1: Aparência dos olhos e descarga ocular

Fonte: Monique Lima, CEA/IOC, 2021.



Figura 2: Autolimpeza

Fonte: Monique Lima, CEA/IOC, 2021.



Figura 3: Alopecia por barbeamento

Fonte: Monique Lima, CEA/IOC, 2021



Figura 4: Fornecimento da alimentação de forma facilitada

Fonte: Monique Lima, CEA/IOC, 2021.

## 9 | REPERTÓRIO DE AVALIAÇÃO

SINAL OU COMPORTAMENTO	COMENTÁRIOS	AVALIAÇÃO
Postura anormal	A postura curvada é um sinal geral de dor ou doença.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não curvado</li> <li>• Encurvado de forma intermitente</li> <li>• Encurvado permanentemente</li> </ul>
Alterações na atividade em grupo	As atividades sociais podem ser afetadas pela dor e/ou o curso da doença.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interação com os pares, movimentos e comportamentos típicos da espécie, curioso, responsivo, padrões normais de comportamento provocados (por exemplo, reação de fuga, ao se aproximar)</li> <li>• Interrupções na atividade, padrões de comportamento moderados, mesmo quando provocados, ingestão reduzida de alimentos</li> <li>• Sem resposta, letárgico, sem ingestão de comida</li> </ul>
Mudanças na atividade/mobilidade	A diminuição da mobilidade pode ser localizada na área da dor (por exemplo, membro) ou pode ser generalizada. Roedores com dor geralmente têm atividade diminuída, mas atividade aumentada também pode ser observada. Outros comportamentos anormais incluem arquear dorso, contração da região abdominal e cambalear.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Locomoção espontânea sem ser provocada, ou durante o sono, após abertura da gaiola e provocação</li> <li>• Locomoção após ser provocada, cambaleante, ataxia, marcha difícil</li> <li>• Sem locomoção</li> </ul>

Alterações na expressão facial	A utilização de uma escala de caretas pode ser benéfica na identificação da dor. As expressões faciais podem ser escalonadas por evidência em fotografias, gravações de vídeo digital ou ao vivo.	<p><u>Escalas de caretas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estreitamento/fechamento dos olhos</li> <li>• Protuberâncias nasais e de bochechas</li> <li>• Posicionamento das orelhas</li> <li>• Mudanças na posição e forma das vibrissas</li> </ul> <p><u>Escalas de abertura dos olhos</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Abertura &gt; 75%</li> <li>• Abertura de 50% a 75%</li> <li>• Abertura de 25% a 49%</li> <li>• Abertura de &lt; de 25%</li> </ul>
Diminuição da temperatura corporal	Animais que sentem frio ao toque provavelmente estão gravemente hipotérmicos e podem estar em estado moribundo. Avaliações de temperatura central e de superfície podem ter variações.	Hipertermia > de 3°C da temperatura normal Hipotermia < 3°C da temperatura normal
Diminuição da ingestão de alimentos e/ou água	Pode estar associada à perda de peso, desidratação e diminuição da produção de urina/fezes. Tensão de pele prolongada indica desidratação. A pontuação da condição corporal pode ser mais útil do que o peso corporal em algumas circunstâncias.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem alteração de peso</li> <li>• Perda de 5-10%</li> <li>• Perda de 11-15%</li> <li>• Perda de 16-19%</li> <li>• Perda de &gt; 20%</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Turgor da pele normal</li> <li>• Turgor cutâneo reduzido (dobra cutânea persistente)</li> </ul>
Diminuição do <i>grooming</i> , piloereção	A pelagem parece desalinhada, os pelos podem estar arrepiados.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pelagem brilhante, justo ao corpo/ Asseio normal</li> <li>• Pelagem brilhante, piloereção parcial/ Higiene reduzida, região anal manchada</li> <li>• Pelagem alterada e sem brilho, piloereção acentuada/ Sem higiene, região anal manchada e incrustada</li> </ul>
Diminuição da construção do ninho	Particularmente significativo em camundongos, que têm um forte impulso para construir ninhos, podendo ser um sinal de alterações expressivas no bem-estar. A ferramenta de avaliação de complexidade de ninho pode ser empregada.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ninho complexo</li> <li>• Ninho plano, paredes mais altas que os camundongos</li> <li>• &gt; de 80% material de ninho usado, ninho perceptível</li> <li>• &gt; de 80% material de ninho usado, ninho manipulado</li> <li>• Material de ninho levemente manipulado</li> <li>• Material de ninho não manipulado</li> </ul>
Diminuição da resposta à estimulação externa	Tentativas de fuga quando manuseadas são normais em roedores, a menos que estejam bem habituados a manusear - a falha em exibir esse comportamento pode indicar dor ou angústia.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Avaliação de déficits gerais em bancada aberta: reação a ruídos e atividade (apatia e letargia)</li> <li>• Reação de postura e equilíbrio</li> <li>• Avaliação de déficits focais: simetria corpórea; marcha; escalada em ângulo de 45°; movimento circular; simetria de membro anterior e movimento circulatório obrigatório</li> </ul>
Frequências respiratórias e cardíacas	Os impulsos dolorosos levam à ativação hipotalâmica e ao aumento da atividade do sistema simpático-adrenérgico. Essa ativação resulta em efeitos cardiovasculares substanciais. A pletismografia pode ser utilizada para monitorar a função respiratória.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taquipneia ou padrão anormal de respiração (superficial, abdominal)</li> <li>• Aumento da frequência cardíaca</li> </ul>

# 10 | ILUSTRAÇÃO DAS ESCALAS DE EXPRESSÃO FACIAL EM CAMUNDONGOS E RATOS (*THE MOUSE GRIMACE SCALE E THE RAT GRIMACE SCALE*)

## a. Escala de Expressão Facial em camundongos

**NC 3R<sup>s</sup>** National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research

### Escala de Expressão Facial em Camundongo

Pesquisas têm demonstrado que alterações na expressão facial é um meio para a avaliação de dor em camundongos.

A Escala de Expressão Facial em Camundongo foi elaborada utilizando unidades de ação específicas faciais mostradas abaixo. Essas unidades de ação aumentam na intensidade em resposta à dor pós-procedimento e podem ser usadas como parte da avaliação clínica.

As unidades de ação devem ser usadas apenas em animais acordados. Cada animal deve ser observado por um período curto de tempo para evitar pontuar alterações temporárias na expressão facial que não estejam relacionadas à dor.

	Unidades de ação		
	Ausente "0"	Moderadamente presente "1"	Obviamente presente "2"
<b>Estreitamento orbital</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Fechamento palpebral (construção da área orbital)</li><li>Uma ruga pode ser visível ao redor do olho</li></ul>			
<b>Protuberância nasal</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Protuberância nasal saliente</li><li>Rugas verticais na lateral do nariz</li></ul>			
<b>Protuberância da bochecha</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Bochechas salientes</li></ul>			
<b>Posicionamento das orelhas</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Orelhas rotacionadas para fora e/ou para trás, afastando-se da face</li><li>Orelhas podem se dobrar e apresentar uma forma "pontaguda"</li><li>Espaçamento maior entre as orelhas</li></ul>			
<b>Alteração na vibrissa</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Vibrissas estão voltadas para trás contra a bochecha, ou para frente "em pé"</li><li>Vibrissas perdem sua curvatura natural "para baixo" ou se aglomeram</li></ul>			

Por favor, consulte o artigo original para detalhes: Langford DJ, Bailey AL, Chendi M, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingram J, Klassen-Ross T, LaCroix-Fralish ML, Matsumiya L, Serge RE, Sotoboni SO, Tabata JM, Wong D, van den Meegenberg AMJM, Ferrari MO, Craig D, Maggi LB, 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods* 7(8): 447-449. doi: 10.1038/nmeth.1455

Para orientação sobre o uso de Escala de Expressão Facial em Camundongo, pesquise artigos que apoiem essa técnica, e para escalas de expressão facial em outras espécies, visite [www.nc3rs.org.uk/grimacescales](http://www.nc3rs.org.uk/grimacescales).

Para solicitar cópias deste pôster, envie um e-mail: [enquiries@nc3rs.org.uk](mailto:enquiries@nc3rs.org.uk). O NC3Rs fornece uma variedade de recursos dos 3Rs em [www.nc3rs.org.uk/resources](http://www.nc3rs.org.uk/resources).

Imagens cedidas gentilmente pelo Dr. Jeffrey Mogil, McGill University. Traduzido para o português por Dra Karen Maciel de Oliveira, Universidade Federal de São Paulo, e Dr Douglas Lopes, University College London.

Fonte: Escala de expressão facial de camundongos de Langford *et al.*, 2010. Imagens Dr. Jeffrey Mogil, (McGill University). Este pôster e mais informações estão disponíveis no NC3R's (*National Centre for the 3R's in the UK*).

## b. Escala de Expressão Facial em ratos



National Centre  
for the Replacement  
Refinement & Reduction  
of Animals in Research

# Escala de Expressão Facial em Rato

Pesquisas têm demonstrado que alterações na expressão facial é um meio para a avaliação de dor em ratos.

A Escala de Expressão Facial em Rato foi elaborada utilizando unidades de ação específicas faciais mostradas abaixo. Essas unidades de ação aumentam na intensidade em resposta à dor pós-procedimento e podem ser usadas como parte da avaliação clínica.

As unidades de ação devem ser usadas apenas em animais acordados. Cada animal deve ser observado por um período curto de tempo para evitar registrar alterações temporárias na expressão facial que não estejam relacionadas ao bem-estar animal.

	Unidades de ação		
	Ausente "0"	Moderadamente presente "1"	Obviamente presente "2"
<b>Estreitamento orbital</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Fechamento palpebral (constricção da área orbital)</li><li>Uma ruga pode ser visível ao redor do olho</li></ul>			
<b>Achatamento de nariz/bochecha</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Achatamento e alongamento da ponte nasal</li><li>Achatamento das bochechas (com aparência afundada)</li></ul>			
<b>Alterações das orelhas</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Orelhas se curvam para dentro e são anguladas para a frente com uma forma pontiaguda</li><li>Espaçamento maior entre as orelhas</li></ul>			
<b>Alteração na vibrissa</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Vibrissas enrijecem e angulam ao longo da face</li><li>Vibrissas podem se aglomerar</li><li>Vibrissas perdem sua curvatura natural "para baixo"</li></ul>			

Por favor, consulte o artigo original para detalhes: Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JB, Mapplebeck JCS, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. 2011. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain* 7:55. doi: 10.1186/1744-8069-7-55

Para orientação sobre o uso de Escala de Expressão Facial em Rato, pesquise artigos que originaram essa técnica, e para escalas de expressão facial em outras espécies, visite [www.nc3rs.org.uk/igrmacescales](http://www.nc3rs.org.uk/igrmacescales).

Para solicitar cópias deste pôster, envie um e-mail: [enquiries@nc3rs.org.uk](mailto:enquiries@nc3rs.org.uk). O NC3Rs fornece uma variedade de recursos dos 3Rs em [www.nc3rs.org.uk/resources](http://www.nc3rs.org.uk/resources).

Imagens cedidas gentilmente pelo Dr. Jeffrey Mogil, McGill University. Traduzido para o português por Dra Karen Maciel de Oliveira, Universidade Federal de São Paulo, e Dr Douglas Lopes, University College London.

Fonte: Escala de expressão facial de ratos de Sotocinal *et al.*, 2011. Imagens Dr. Jeffrey Mogil, (McGill University). Este pôster e mais informações estão disponíveis no NC3R's (National Centre for the 3R's in the UK).



## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo; 2004. 166p.
- ARRAS, M.; RETTICH, A.; CINELLI, P.; KASERMANN, H. P.; BURKI, K. Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. **BMC Vet Res**. 2007, Aug 2;3:16.
- BAKER, H.; LINDSEY J.; WEISBROTH, S. *The Laboratory Rat*. **New York: Academic Press**, 1979.
- BRASIL. Concea, RN25. **Baixa o Capítulo “Introdução Geral” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal – CONCEA**, 2015.
- CCAC guidelines: Identification of scientific endpoints, humane intervention points, and cumulative endpoints. Date of Publication: March 2022. **Canadian Council on Animal Care**, 2022. ISBN: 978-0-919087-95-8.
- CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: a review. **Comp Med**. 2009 Dec; 59(6):517-26.
- DONATH, S.; AN, J.; LEE, S. L. L.; GERTZ, K.; DATWYLER, A. L.; HARMS, U.; MÜLLER, S.; FARR, T. D.; FÜCHTEMEIER, M.; LÄTTIG-TÜNNEMANN, G.; LIPS, J.; FODDIS, M.; MOSCH, L.; BERNARD, R.; GRITNER, U.; BALKAYA, M.; KRONENBERG, G.; DIRNAGL, U.; ENDRES, M.; HARMS, C. (2016). Interaction of ARC and Daxx: A novel endogenous target to preserve motor function and cell loss after focal brain ischemia in mice. **J Neurosci** 36, 8132-8148.
- FENWICK, N.; AND GRIFFIN, G. (2013) **Balancing reduction and refinement**. Alternatives to Laboratory Animals 41(3):P33-P35.
- GARNER, J. P.; MASON, G. J. Evidence for a relationship between cage stereotypies and behavioural disinhibition in laboratory rodents. **Behavioural Brain Research**, Volume 136, Issue 1, 2002, Pages 83-92.
- GARNER, J. P. Stereotypies and other abnormal repetitive behaviors: potential impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes. **ILAR J**. 2005; 46(2):106-17.
- GASKILL, B. N.; GORDON, C. J.; PAJOR, E. A.; LUCAS, J. R.; DAVIS, J. K.; GARNER, J. P. 2013. Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. **Physiol Behav** 110-111:87–95.
- GRAF, R.; CINELLI, P.; ARRAS, M. Morbidity scoring after abdominal surgery. **Laboratory Animals**. 2016;50(6):453-458.
- HANKENSON, F. C.; RUSKOSKI, N.; VAN SAUN, M.; YING, G. S.; OH, J.; FRASER, N. W. (2013). Weight loss and reduced body temperature determine humane endpoints in a mouse model of ocular herpesvirus infection. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science** 52, 277-285.

HAWKINS, P.; MORTON, D. B.; BURMAN, O.; DENNISON, N.; HONESS, P.; JENNINGS, M.; LANE, S.; MIDDLETON, V.; ROUGHAN, J. V.; WELLS, S.; WESTWOOD, K. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. **Laboratory Animals** 2011; 45: 1–13.

HEFFNER, H. E.; HEFFNER, R. S. Hearing ranges of laboratory animals. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. 2007; 46:11-3.

HENDRIKSEN, C. F. M.; MORTON, D. B. (editors). Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research. **Proceedings of the International Conference**; 22–25 November 1998; Ziest, The Netherlands. London: The Royal Society Medical Press; 1999.

HENDRIKSEN, C.; MORTON, D.; CUSSLER, K. (2011). Use of humane endpoints to minimise suffering. In *The Cost Manual of Laboratory Animal Care and Use* (ed. B. Howard, T. Nevalainen & G. Perretta), pp. 333–353. **Boca Raton, FL, USA: CRC Press**.

HESS, S. E.; ROHR, S.; DUFOUR, B. D.; GASKILL, B. N.; PAJOR, E. A.; GARNER, J. P. Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, 47 (2008), pp. 25-31.

HOWARD, B.; NEVALAINEN, T.; PERRETTA, G. **The COST manual of laboratory animal care and use: refinement, reduction, and research**. CRC Press 2016. <https://doi.org/10.1201/b13591>

INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESEARCH. **Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório**. Institute of Laboratory Animal Research. 8ª edição. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2014. p. 29-30.

JACOBY, R. O.; FOX, J. G.; DAVISSON, M. Biology and Diseases of Mice. **Laboratory Animal Medicine**. 2002; 35-120.

JIRKOF, P.; FLEISCHMANN, T.; CESAROVIC, N.; RETTICH, A.; VOGEL, J.; ARRAS, M. 2013. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. **Lab Anim** 47:153–161.

LANGFORD, D.; BAILEY, A.; CHANDA, M.; CLARKE, S. E.; DRUMMOND, T. E.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M. L.; MATSUMIYA, L.; SORGE, R. E.; SOTOCINAL, S. G.; TABAKA, J. M.; WONG, D.; VAN DEN MAAGDENBERG, A. M.; FERRARI, M. D.; CRAIG, K. D.; MOGIL, J. S. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nat Methods** 7, 447–449 (2010).

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M. Finalização humanitária. *In*: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 603-15.

LITTIN, K.; ACEVEDO, A.; BROWNE, W.; EDGAR, J.; MENDEL, M.; OWEN, D.; SHERWIN, C.; WÜRBEL, H.; NICOL, C. Towards humane endpoints: behavioural changes precede clinical signs of disease in a Huntington's disease model. **Proc Biol Sci**. 2008 Aug 22;275(1645):1865-74.

MEI, J.; RIEDEL, N.; GRITNER, U.; ENDRES, M.; BANNEKE, S.; EMMRICH, J. V. Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. **Sci Rep**. 2018 Feb 23;8(1):3526.

- MEI, J.; BANNEKE, S.; LIPS, J.; KUFFNER, M. T. C.; HOFFMANN, C. J.; DIRNAGL, U.; ENDRES, M.; HARMS, C.; EMMRICH, J. V. Refining humane endpoints in mouse models of disease by systematic review and machine learning-based endpoint definition. **ALTEX**. 2019;36(4):555-571. Epub 2019 Apr 18.
- MORTON, D. B.; GRIFFITHS, P. H. M. 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. **Vet Rec**, 116:431– 436.
- MORTON, D. B. & TOWNSEND, P. (1995). Dealing with Adverse Effects and Suffering During Animal Research. *In: Laboratory Animals - An Introduction for Experimenters*, 2nd Edn., (ed. A.A. Tuffery).
- MORTON, D. B. Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research. London: The Royal Society Medical Press; 1999. Humane endpoints in animal experimentation for biomedical research: **Ethical, legal and practical aspects**; pp. 5–12.
- MORTON, D. B. A systematic approach for establishing humane endpoints. **ILAR J**. 2000;41(2):80–86.
- NEMZEK, J. A.; XIAO, H. Y.; MINARD, A. E.; BOLGOS, G. L.; REMICK, D. G. (2004). Humane endpoints in shock research. **Shock** 21, 17-25.
- NRC. National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals. **Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals**. Washington (DC): National Academies Press (US); 2008. PMID: 20669418.
- NUNAMAKER, E. A.; ARTWOHL, J. E.; ANDERSON, R. J. & FORTMAN, J. D. Endpoint Refinement for Total Body Irradiation of C57BL/6 Mice. **Comparative Medicine** 63, 7, 2013.
- NUNAMAKER, E. A.; DAVIS, S.; O'MALLEY, C.I.; TURNER, P.V. Developing Recommendations for Cumulative Endpoints and Lifetime Use for Research Animals. **Animals** 2021, 11, 2031.
- REINHARDT, V. 2005. Hair pulling: a review. **Lab Anim** 39:361–369.
- ROCK, M. L.; KARAS, A. Z, RODRIGUEZ KB, GALLO MS, PRITCHETT-CORNING K, KARAS RH, ARONOVITZ M, GASKILL BN. 2014. The time-to-integrate-to-nest test as an indicator of wellbeing in laboratory mice. **J Am Assoc Lab Anim Sci** 53:24–28.
- SIROIS, M. **Medicina de Animais de Laboratório**: Princípios e procedimentos. São Paulo: Editora Roca, 2007.
- SOOTHILL, J. S.; MORTON, D. B.; AHMAD, A. The HID50 (hypothermia-inducing dose50): an alternative to the LD50 for measurement of bacterial virulence. *Int J Exp Path* 73:95–98, 1992.
- SOTOCINAL, S. G.; SORGE, R. E.; ZALOUM, A.; TUTTLE, A. H.; MARTIN, L. J.; WIESKOPF, J. S.; MAPPLEBECK, J. C.; WEI, P.; ZHAN, S.; ZHANG, S.; MCDOUGALL, J. J.; KING, O. D.; MOGIL, J. S. 2011. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Mol Pain** 7:1–10.
- TOTH, L. A. Identifying and Implementing Endpoints for Geriatric Mice. **Comp. Med.** 8(6): 439- 451, 2018.

ULLMAN-CULLERÉ, M.; FOLTZ, CHARMAINE. (1999). Body Condition Scoring: A Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in Mice. **Laboratory animal science**. 49. 319-23.

WARN, P. A.; BRAMPTON, M. W.; SHARP, A.; MORRISSEY, G.; STEEL, N.; DENNING, D. W.; PRIEST, T. (2003) Infrared body temperature measurement of mice as an early predictor of death in experimental fungal infections. **Lab Anim** 37: 126–131.

WINN, C. B.; HWANG, S. K.; MORIN, J.; BLUETTE, C. T.; MANICKAM, B.; JIANG, Z. K.; GIDDABASAPPA, A.; LIU, C. N.; MATTHEWS, K. (2021) Automated monitoring of respiratory rate as a novel humane endpoint: A refinement in mouse metastatic lung cancer models. **PLOS ONE** 16(9): e0257694.

WONG, J. P.; SARAVOLAC, E. G.; CLEMENT, J. G.; NAGATA, L. P: Development of a murine hypothermia model for study of respiratory tract influenza virus infection. **Lab Anim Sci** 47:143–147, 1997.