

# ESTUDOS EM INFECÇÕES EXPERIMENTAIS: DOENÇAS PARASITÁRIAS E FÚNGICAS

*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

### **Isabele Barbieri dos Santos**

Centro de Experimentação Animal,  
Instituto Oswaldo Cruz, Fundação  
Oswaldo Cruz,  
Rio de Janeiro/RJ  
ORCID 0009-0002-6362-6329

modelos animais forneceram informações essenciais no estudo de doenças infecciosas, sendo necessários para a compreensão do processo inflamatório; das doenças infecciosas específicas e seus tratamentos farmacológicos; no desenvolvimento de vacinas e testes de eficácia e segurança; e para fins de diagnóstico, em medicina humana e veterinária (OLFERT; GODSON, 2000).

Para Colby e colaboradores (2017), o projeto experimental para pesquisa de doenças infecciosas empregando modelos animais requer algumas considerações, entre elas: o entendimento das características inerentes ao modelo animal e ao organismo infeccioso de interesse; a definição objetiva e clara da pesquisa; a compreensão da resposta do animal frente à infecção; a semelhança da doença no sistema modelo em comparação com a condição humana e a disponibilidade de reagentes. Todos esses fatores devem ser considerados juntamente com a ética e o bem-estar animal, incluindo uso de pontos finais humanitários.

## 1 | INTRODUÇÃO

O interesse na prevenção e no tratamento de doenças infecciosas existe há milhares de anos. No entanto, foi apenas em meados do século XIX que os cientistas identificaram os microrganismos como o agente causador. À medida que aumentava a nossa compreensão frente à resposta do hospedeiro durante a infecção, foi se desenvolvendo a nossa capacidade de elaborar vacinas e terapias.

Desde o trabalho de pioneiros como Jenner e Pasteur, há mais de um século, os

Os animais usados na pesquisa de doenças infecciosas podem sentir dor e/ou desconforto resultante do processo da doença, e antever precocemente os sinais pode resultar em reduções significativas no potencial de dor experimentado por esses animais. Os pontos finais humanitários devem ser baseados em valores de variáveis cientificamente válidas, fornecendo informações objetivas sobre o curso da doença (e do possível resultado) no qual um desfecho possa ser antecipado de forma assertiva.

Os padrões éticos geralmente exigem o término de experimentos com animais antes do sofrimento óbvio, o que impossibilita que os estudos de sobrevivência usem a morte real como uma leitura válida. Em particular, a definição de pontos finais humanitários (*endpoints*) objetivos e robustos para a pesquisa de doenças infecciosas tem se mostrado difícil. A objetividade na aplicação de parâmetros humanitários reduz o viés do usuário e, assim, melhora os projetos de estudo em ensaios terapêuticos pré-clínicos, confiabilidade nos resultados e padronização entre laboratórios. Em última análise, a implementação de parâmetros humanitários objetivos e apropriados reduz o número de animais necessários para testar um determinado fenômeno.

A preocupação pública com questões como o bem-estar animal e a validade científica está aumentando, resultando em crescentes demandas regulatórias para a pesquisa com animais, e cumprir os padrões de bem-estar animal, embora tendo os objetivos científicos como de grande importância, muitas vezes é um desafio. Para isso, os pontos finais humanitários dos estudos envolvendo doenças crônicas e progressivas precisam ser estabelecidos considerando quão precocemente no processo da doença os objetivos científicos podem ser alcançados sem causar dor e desconforto aos animais, ou ao menos minimizá-los, caso inevitáveis.

## 2 | MODELOS ANIMAIS PARA DOENÇAS INFECCIOSAS

Os primeiros passos no desenvolvimento de um modelo animal de doença infecciosa são esclarecer os objetivos específicos do estudo e, em seguida, definir as questões de pesquisa. Esses objetivos devem ser claramente articulados para que o modelo animal escolhido possa ser desenvolvido com a compreensão de seus benefícios e limitações.

Muitos dos patógenos que causam doenças infecciosas humanas não infectam roedores ou outras espécies de mamíferos. O desenvolvimento de modelos animais que permitam o estudo da patogênese desses agentes e avaliação da eficácia de medicamentos é fundamental para identificar as formas de prevenção e tratamento de doenças infecciosas humanas. Os modelos animais podem ser usados de várias maneiras para estudar a patogênese da doença, interações hospedeiro-patógeno e mecanismos de proteção ou tratamento da doença, e esses modelos podem ser naturais ou substitutos.

Os modelos naturais de doenças fazem uso de um patógeno específico e seu hospedeiro natural e têm a vantagem de modelar a interação entre hospedeiro e patógeno,

dentro do contexto biológico apropriado. Isso é importante, pois permite a análise de fatores de virulência e seu papel na invasão, penetração e toxicidade, bem como a resposta imune do hospedeiro ao patógeno. Já os modelos substitutos referem-se ao uso de espécies que só podem ser infectadas com o patógeno de interesse em condições experimentais e estes forneceram uma ferramenta útil para estudar aspectos específicos da patogênese da doença ou da resposta imune do hospedeiro. Avanços recentes na criação de camundongos *knockout* de genes constitutivos ou condicionais abriram as portas para a compreensão do papel de genes hospedeiros específicos no reconhecimento de patógenos, na indução de imunidade inata e/ou adquirida, bem como interações celulares do sistema imunológico (GERDTS *et al.*, 2007).

A identificação do tropismo do órgão ou tecido e a análise da fisiopatologia dos órgãos-alvo são fundamentais para o estabelecimento do modelo animal, pois fornecem informações sobre o mecanismo molecular da infecção, a resposta do hospedeiro à infecção e o papel ou função da intervenção proposta. Além disso, durante a consideração da proposta de pesquisa baseada em animais, uma análise de dano-benefício deve ser realizada para avaliar se os danos previstos para os animais são justificados pelos benefícios potenciais da pesquisa. Nesse contexto, “dano” a um animal inclui não apenas agravo físico direto (por exemplo, desconforto e dor), mas também outras deficiências no bem-estar animal. Tanto os danos discretos quanto os danos cumulativos experimentados pelos animais ao longo de todo o experimento devem ser considerados. Já os benefícios potenciais da análise de dano-benefício incluem resultados experimentais que promovam diretamente a melhoria na saúde ou o bem-estar dos seres humanos (por exemplo, o desenvolvimento de novos tratamentos de doenças), bem como avanços mais amplos ou indiretos, incluindo a expansão do conhecimento científico e melhoria da saúde dos animais ou do ecossistema (BRØNSTAD *et al.*, 2016).

Assim como é necessário selecionar o animal mais apropriado para a pesquisa de doenças infecciosas, a seleção de um organismo infeccioso com composição genética adequada também é crucial. Além do gênero e da espécie, os pesquisadores também devem considerar a cepa do agente, pois esta pode diferir marcadamente em sua patogênese devido a muitos fatores, incluindo o animal do qual foi originalmente isolada, bem como os ambientes de cultura e crescimento em que foram mantidas (FUX *et al.*, 2005).

### 3 | RESPOSTAS FISIOLÓGICAS ÀS INFECÇÕES

Nas pesquisas em doenças infecciosas, devem ser consideradas as respostas fisiológicas do modelo animal à infecção e a semelhança da progressão da doença em comparação com a espécie hospedeira (por exemplo, humanos). A morbidade e mortalidade são tipicamente os primeiros critérios avaliados, principalmente no contexto de doenças de alta infectividade. Avaliar a morbidade requer a identificação das alterações clínicas e o

momento de seu início durante a progressão da doença.

Os parâmetros como as mudanças na temperatura ou no peso corporal geralmente são indicadores úteis de doença animal, pois são medidas facilmente obtidas. As observações de sinais clínicos, como mudanças no apetite ou nível de atividade após a infecção, também podem ser apropriadas, mas são subjetivas e requerem um conhecimento prático completo da fisiologia e comportamento animal (COLBY *et al.*, 2017).

Muitos autores indicam a mensuração da temperatura como importante para o estabelecimento da gravidade da doença, do estado moribundo e da morte iminente em uma variedade de modelos de doenças infecciosas. No entanto, a aplicação e a interpretação dessa medida podem ser complexas, pois a temperatura corporal dos camundongos é influenciada por vários fatores, incluindo a hora do dia, a temperatura ambiente, o tipo de cama e o número de companheiros de gaiola (TOTH, 2000; ADAMSON *et al.*, 2013). Portanto, para interpretar com precisão as medidas de temperatura corporal em relação aos critérios de finalização humanitária e minimizar conclusões experimentais errôneas, cada uma dessas variáveis potenciais deve ser mantida constante para um determinado experimento.

As alterações na temperatura corporal são uma ocorrência comum em estudos de doenças infecciosas e podem ser usadas como fatores preditivos para a finalização humanitária, comparadas ao óbito do animal ou sua condição moribunda. A resposta inicial da temperatura corporal à infecção é febre ou hipertermia, no entanto, particularmente em modelos murinos de doenças infecciosas, a febre pode ser transitória.

A diminuição da temperatura corporal, ou hipotermia, no entanto, pode ser um indicador importante de um agravamento na condição de saúde do animal, principalmente em doenças específicas ou estados tóxicos. Animais em estado séptico perdem a capacidade de manter a temperatura corporal e uma diminuição da temperatura corporal abaixo de 34,5°C foi correlacionada com o óbito dos animais em vários modelos de doenças infecciosas (HANKENSON *et al.*, 2013). Além disso, dados de camundongos avaliados individualmente mostraram que tanto a frequência cardíaca quanto a temperatura corporal foram relativamente estáveis durante a maior parte da vida do animal, mas caíram vertiginosamente durante as 3 semanas que precederam sua morte (TANKERSLEY *et al.*, 2003).

Gavin e Satchell (2017) relataram que a finalização humanitária baseada em hipotermia pode ser aplicada em estudos de DL50, sem a preocupação de reduzir a validade do experimento, e, com isso, reduzindo a dor e o desconforto dos animais precocemente, consistindo em um preditor valioso de sobrevivência em estudos de toxicidade.

O uso da termometria retal para monitorar a temperatura central dos animais pode ser empregado, porém esse método pode resultar em um aumento do nível de estresse devido ao manuseio do animal (WARN *et al.*, 2003). Outros métodos de aferição de temperatura podem ser realizados por meio de termômetro infravermelho (afere a temperatura de

superfície) ou um método mais moderno de implantação de um chip no subcutâneo (entre as escápulas), que permite a aferição remota da temperatura (HANKENSON *et al.*, 2013).

Além da temperatura, o peso corporal também é usado para determinar o ponto final humanitário como fator isolado, bem como associado a outros parâmetros, como sinais clínicos de dor e temperatura corporal. Embora uma perda de peso de mais de 20% em comparação com o peso inicial seja amplamente considerada como um ponto de finalização humanitária comum, alguns autores utilizaram uma perda de peso superior a 15% (TAKAYAMA-ITO *et al.*, 2017) ou uma perda de peso absoluta superior a 0,05g por dia como indicador de maior risco de óbito (HANKENSON *et al.*, 2013). O desafio de usar apenas as alterações do peso corporal como critério único é que a perda substancial de peso nem sempre leva o animal ao óbito e que, a depender do tipo de infecção experimental, os animais podem vir a óbito sem qualquer alteração no peso. As quantidades totais de peso perdido, bem como sua duração e consistência, devem ser usadas para determinar o ponto final humanitário para modelos animais de doenças infecciosas. Animais em decúbito ou que perderam a capacidade de alcançar comida e água perderão peso rapidamente, e essa observação deve influenciar o ponto final humanitário escolhido.

Outros indicadores são comumente usados em combinação para os pontos finais humanitários, mas alguns envolvem julgamentos subjetivos, e o uso de vários indicadores requer uma cuidadosa consideração. Uma abordagem através de “folha de pontuação”, observando se os indicadores estão presentes ou ausentes ou atribuindo pontuações numéricas a eles, pode fornecer um complemento útil para os observadores, ajudando a melhorar a objetividade da metodologia.

Para levar em consideração os parâmetros exclusivos de cada modelo, recomenda-se a realização de um estudo piloto com uma pequena coorte de animais para determinar efetivamente os fatores preditivos para um modelo ou condição específica quando um modelo semelhante ou experiência anterior não estiver disponível.

## 4 | RESPOSTAS DE FASE AGUDA

A aplicação dos pontos finais humanitários é um componente-chave para refinar os estudos para cumprir os princípios 3R's. Em modelos de doença aguda, a morte pode ocorrer em poucas horas após uma intervenção experimental, o que requer acompanhamento intensivo para a determinação do ponto final humanitário.

Os aumentos nos níveis séricos de citocinas e proteínas de fase aguda ocorrem precocemente, antes mesmo de alterações comportamentais e sinais observáveis. Essas alterações bioquímicas podem servir como indicadores da presença de doenças infecciosas e como preditores tanto da gravidade quanto do resultado da doença infecciosa. À medida que o estado da doença infecciosa progride, há alterações fisiológicas e comportamentais que podem desencadear o aparecimento da dor e do distresse no animal. Essas alterações

podem ser avaliadas por meio de observações/listas de verificação para o estabelecimento dos pontos preditivos do resultado experimental e de morte iminente. O experimento pode, então, ser encerrado quando a alteração de comportamento e da fisiologia excedem um ponto predefinido (o ponto final).

As proteínas de fase aguda são bem reconhecidas por sua aplicação na medicina diagnóstica humana e foram descritas como tendo valor no diagnóstico e prognóstico de doenças cardiovasculares, autoimunidade, transplante de órgãos e tratamento de câncer (DEANS, WIGMORE, 2005; RIDKER, 2007). A proteína C-reativa (PCR) foi a primeira proteína de fase aguda descrita (no início da década de 1930), e sua presença no início da infecção pneumocócica de macacos e humanos levou à criação do termo “fase aguda”. Hoje, a PCR continua sendo uma proteína de fase aguda de interesse primário em humanos, como um importante marcador de infecção, doença autoimune, trauma, malignidade e necrose, incluindo infarto do miocárdio. Além disso, a PCR foi proposta como um marcador para avaliações de bem-estar, que é um papel comum proposto em muitos estudos de proteína de fase aguda em humanos e animais (KAO, SHIESH, WU, 2006),

Um efeito das citocinas em animais é a produção de inapetência ou anorexia. Assim, a perda de peso resultante é um indicador cardinal da gravidade da doença infecciosa em modelos animais. O peso corporal pode ser monitorado por vários sistemas de pontuação, e o uso de uma quantidade predeterminada de perda de peso (por exemplo, 10 a 20% ou acima de 20%) como ponto final é recomendado em muitos guias internacionais.

## 5 | PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA E COMPORTAMENTAL EM MODELOS DE DOENÇAS PARASITÁRIAS E FÚNGICAS

Os desfechos humanitários para cada estudo dependerão de fatores que incluem os objetivos, o estágio em que os dados serão obtidos e se um “limite de gravidade” predeterminado foi atingido.

Vários julgamentos precisarão ser feitos, incluindo: a pontuação numérica na qual um animal deve ser submetido à eutanásia ou a cuidados veterinários; se um ou mais fatores devem ser ponderados; e como a duração deve ser levada em consideração (por exemplo, por quanto tempo manter uma pontuação média/alta, mas abaixo do limite). Questões como essas devem ser discutidas pelo pesquisador, veterinário e equipe, com a devida contribuição do comitê de ética para o uso de animais.

### 5.1 Esporotricose

A esporotricose é uma infecção causada pelo fungo *Sporothrix* e ocorre pela contaminação através do solo, plantas e matéria orgânica contaminada com o fungo. A variação da patogenicidade experimental entre as espécies de *Sporothrix* pode estar relacionada a vários fatores, entre eles a plasticidade do isolado/cepa; diferenças entre

as linhagens de camundongos; interação com o hospedeiro; tamanho do inóculo e via de inoculação. A via intravenosa favorece a infecção sistêmica quando comparada com a via subcutânea de inoculação (TACHIBANA *et al.*, 1998). No entanto, a via subcutânea geralmente é a escolhida a fim de mimetizar a infecção natural produzida por mordeduras ou arranhões de gatos.

Em estudos com isolados patogênicos de *Sporothrix*, os camundongos infectados com *S. globosa* não apresentaram lesões esporotricoides e sinais de dor (exceto nódulos no ponto de inoculação) 30 dias após a infecção. O padrão se mantém em camundongos infectados por *S. schenckii*, *S. mexicana* e *S. pallida* até o 21º dia de infecção (inflamação discreta no local da inoculação), porém, as lesões para essas cepas aparecem após 30 dias de infecção, apresentando-se como lesões cutâneas ulceradas ou nodulares mais extensas (CORRÊA-MOREIRA *et al.*, 2021).

Em estudos *in vivo* com *S. brasiliensis*, foi observada lesão nodular firme e não aderente no 10º dia pós-infecção por inoculação subcutânea em camundongos BALB/c. O diâmetro das lesões aumentou durante os 21 dias de infecção, no entanto as lesões começaram a diminuir de tamanho a partir do 28º dia e regrediram totalmente no 42º dia (IKEDA *et al.*, 2018).

Em infecção experimental por diferentes isolados clínicos de *S. schenckii* (inoculação via coxim plantar), foram detectados nódulos no 11º dia de infecção, e, após o 30º dia, observaram perda de peso, alteração na pelagem e presença de nódulos supurados, atingindo a coxa e testículos. A depender do isolado clínico, a progressão das lesões e do agravamento da doença foi desigual, variando da regressão total das lesões a 20% de mortalidade em 90 dias (BRITO *et al.*, 2007). As lesões cutâneas podem ser avaliadas e medidas como um parâmetro clínico para a evolução da gravidade da infecção, porém, ela sozinha pode não ser uma boa medida para determinação do ponto final humanitário devido às grandes diferenças no curso da infecção.

Os sinais clínicos em camundongos, como a inatividade e perda de peso, podem ser empregados como pontos de intervenção clínica, juntamente com o tempo de desenvolvimento das lesões cutâneas. Porém, há divergências a respeito do peso como parâmetro único para o ponto final humanitário nesse modelo animal. Della Terra e colaboradores (2017) usaram a perda de peso como uma medida de agravamento clínico, correlacionando-a com a taxa de mortalidade em camundongos infectados por *S. brasiliensis*. Porém, outros estudos não identificaram variações de peso em camundongos imunocompetentes, diferentemente de animais imunossuprimidos, onde a associação da perda de peso com a mortalidade pode chegar a 100% (DE SEQUEIRA *et al.*, 2017; CORRÊA-MOREIRA *et al.*, 2021). No entanto, existem problemas práticos com a aferição do peso, que pode não fornecer uma medida precisa devido ao mascaramento encoberto pelo crescimento dos órgãos ou acúmulo de líquido intraperitoneal.

A avaliação do índice esplênico, medida que expressa a hiperplasia esplênica

atribuída à resposta do hospedeiro à presença do fungo, pode ser um bom parâmetro de agravamento da condição de saúde dos animais infectados. As proporções do baço e do peso corporal vêm sendo empregadas em análises *post-mortem*, juntamente com as avaliações histopatológicas. Porém, o emprego de ferramentas de imagens não invasivas, como a tomografia computadorizada volumétrica e ultrassom de alta frequência, pode ser útil na avaliação do baço com maior refinamento, atendendo de forma mais satisfatória o princípio dos 3R's.

## 5.2 Leishmanioses cutânea e visceral

A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário *Leishmania*. A maioria das infecções por leishmaniose é de origem zoonótica e, em muitos casos, seus reservatórios naturais incluem uma variedade de roedores do deserto, savana e floresta. Assim sendo, os roedores de laboratório são considerados hospedeiros permissivos para a maioria das espécies de *Leishmania* (desde que uma dose alta e/ou via sistêmica de inoculação do parasita seja usada) (HOMMEL *et al.*, 1995).

Os modelos experimentais de leishmaniose cutânea em linhagens de roedores geneticamente suscetíveis e resistentes têm sido utilizados para o entendimento dos mecanismos imunológicos implicados na resistência e suscetibilidade à infecção por *Leishmania*.

Os padrões da doença produzidos em animais experimentais infectados com *Leishmania* diferem amplamente de acordo com a espécie de roedor e a espécie de *Leishmania* usada, variando de refratividade completa a susceptibilidade fatal aguda. Assim, esses animais fornecem modelos excelentes para o espectro da doença leishmaniótica que ocorre em humanos e podem ser usados para explorar os parâmetros imunológicos associados a esses desfechos variáveis da doença (por exemplo, cutânea versus visceral, localizada versus disseminada, cura versus não cicatrização) (SACKS, MELBY, 2001).

Os camundongos são, em geral, hospedeiros pobres para espécies do subgênero *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*), responsáveis pela maior parte das doenças cutâneas e mucocutâneas nas Américas, embora altas doses de algumas cepas possam ser utilizadas para produzir lesões pequenas e persistentes em camundongos BALB/c (CASTILHO *et al.*, 2010). Em contrapartida, os hamsters são altamente suscetíveis a essas espécies, produzindo lesões cutâneas ulcerativas e crônicas (REY *et al.*, 1990).

Os locais de inoculação usados com mais frequência são o coxim plantar (pata traseira) e a derme da orelha. Essa última vem sendo associada à infecção natural transmitida por flebotomíneos na pele. A alteração no local do inóculo, em regra, se correlaciona com o número de organismos viáveis contidos na lesão e as vantagens desses locais são o desenvolvimento da lesão pela observação do inchaço da pata ou do diâmetro da lesão da orelha. As aferições sequenciais podem ser feitas na mesma lesão, sem a

necessidade de submeter o animal à eutanásia. O monitoramento do desenvolvimento da lesão pode ser feito semanalmente e, através da contenção do animal, faz-se a medição da largura e espessura da pata na base do quinto dedo do pé usando um paquímetro. O tamanho da lesão da orelha é monitorado medindo o endurecimento em dois diâmetros com um paquímetro.

Nos locais de infecção tradicionais (pata ou orelha) nem sempre ocorre a úlcera, a medição do tamanho da lesão pode ser um procedimento estressante e os animais podem apresentar dificuldades em se alimentar e se locomover. Robledo e colaboradores (2012) inocularam promastigotas de *Leishmania* por via intradérmica (pele dorsal) em hamsters, resultando em lesões crônicas controladas e uma evolução clínica semelhante ao observado em humanos. O grupo estabeleceu o desenvolvimento da infecção aferindo o tamanho da lesão de acordo com a área de endurecimento e a formação de úlceras. Essa abordagem provou ser versátil e de fácil manejo durante a inoculação; no acompanhamento e na caracterização das lesões; execução de tratamentos por diferentes vias e obtenção de amostras clínicas. Com esse método, o grupo evidenciou a manutenção da qualidade de vida do animal quanto à locomoção, busca por comida e água, além das interações sociais.

O local de inoculação também deve ser observado quanto à presença de hiperemia, inflamação, mordedura e ausência de pelos. Além das avaliações das lesões locais, é importante o monitoramento da aparência física (aparência dos pelos, coordenação, temperatura, aspectos dos olhos, posição das orelhas, *grooming*, defecação, presença de líquido ascítico, agitação e desidratação) e do comportamento (acordado, alerta, curioso, atento, permanece com o grupo, procura se alimentar e se hidratar) (ROBLEDO *et al.*, 2012). Portanto, assim como a esporotricose, a leishmaniose cutânea em modelo animal precisa ser avaliada quanto à gravidade das lesões no local de inoculação em conjunto com outros parâmetros clínicos-comportamentais e fisiopatológicos, para que se possa refinar o ponto final humanitário pretendido, minimizando a dor e o desconforto nos animais.

A leishmaniose visceral (LV) é causada por infecção com membros do complexo de espécies *Leishmania donovani*, e hamsters e algumas cepas de camundongos suscetíveis (C57BL/6, BALB/c) são os modelos experimentais. O modelo de hamster mimetiza muitas características da LV humana sintomática, incluindo hepatoesplenomegalia e alterações hematológicas. Além disso, é caracterizada pelo aumento progressivo da carga parasitária nos órgãos-alvo e evolui para uma síndrome semelhante à caquexia, que se torna fatal após vários meses de infecção. A LV em camundongos pode não ser fatal, pois apresenta infecção crônica estável do baço levando à esplenomegalia, mas o parasitismo do fígado é lentamente resolvido por respostas imunes efetivas (NIETO *et al.*, 2011).

A infecção de camundongos BALB/c ou C57BL/6 com espécies viscerotrópicas de *Leishmania* resulta na multiplicação do parasita no fígado, baço e medula óssea. Durante as primeiras semanas de infecção, os parasitas multiplicam-se rapidamente no fígado; no entanto, quatro semanas depois, os camundongos desenvolvem uma resposta imune Th1

eficaz, eliminando os parasitas, tornando-os resistentes à reinfecção. Enquanto a patologia no fígado é limitada, os parasitas persistem no baço e na medula óssea e a infecção progride por um longo período (KUMAR; NYLÉN, 2012).

Pontos finais humanitários primários e secundários podem ser empregados em estudos de leishmaniose visceral, como a perda de 20% do peso corporal em comparação com o início das infecções; letargia sustentada e/ou diminuição na ingestão alimentar e hídrica (LEWIS *et al.*, 2020).

### 5.3 Malária

A Malária é uma doença causada por um protozoário parasita do gênero *Plasmodium*, transmitido pela picada da fêmea do mosquito *Anophele*. A malária por *Plasmodium falciparum* mata milhões de pessoas por ano em todo o mundo, principalmente devido a duas complicações principais: malária cerebral e anemia grave. Os modelos animais são ferramentas essenciais na pesquisa da malária. As espécies de *P. berghei*, que infecta roedores, e *P. knowlesi*, que infecta primatas, apresentam uma biologia básica semelhante à das espécies infectantes de humanos e, portanto, são comumente usadas em pesquisas. Existem várias razões para o uso de modelos animais para estudar a malária, entre elas, o fato de que os modelos permitem investigar o progresso da doença e estudos de órgãos para os quais o parasita é sequestrado, como baço, pulmões e cérebro.

As infecções causadas por parasitas como *P. berghei* e algumas cepas de *P. vinckei*, *P. yoelii* e *P. chabaudi* causam infecções letais em camundongos, enquanto outras cepas das mesmas espécies de parasitas são eliminadas após a parasitemia aguda inicial (SANNI *et al.*, 2002).

Os modelos de malária cerebral experimental foram desenvolvidos em macacos, ratos e camundongos e, embora nenhum deles mimetize exatamente a síndrome humana, diferentes modelos representam certos aspectos da malária cerebral em humanos. A disponibilidade de diferentes cepas de camundongos, incluindo vários camundongos *knockouts*, permitiu-nos obter uma visão dos mecanismos moleculares envolvidos na patologia cerebral. Várias espécies de *Plasmodium* estão disponíveis para estudo, embora a *P. berghei* seja conhecida por sequestrar para dentro da microvasculatura cerebral.

Os camundongos C57BL/6 infectados com estágios sanguíneos de *P. berghei* ANKA são comumente usados como uma cepa suscetível, e uma elevada porcentagem desses camundongos desenvolve sinais de danos cerebrais entre os dias 5 e 7 de infecção e, subsequentemente, morte nos próximos 2 ou 3 dias. Os sinais de danos cerebrais mais frequentemente encontrados são: ataxia, convulsões, paralisia e coma (DELLAVALLE *et al.*, 2014).

A malária cerebral experimental leva a alterações marcantes no comportamento do camundongo 36 horas antes do óbito. Dados obtidos através de testes de triagem

primária SHIRPA (protocolo sistemático e objetivo para análise de fenótipo) confirmaram que os camundongos desenvolvem uma ampla gama de deficiências comportamentais e funcionais no curso progressivo da malária cerebral em comparação com animais sadios (LACKNER *et al.*, 2006).

Além das avaliações de sinais comportamentais/neurológicos, a mensuração da temperatura pode ser um bom preditor de morte na pesquisa de malária cerebral, pois detecta rapidamente uma disfunção na manutenção da temperatura, uma função corporal complexa e essencial. Uma temperatura abaixo de 32°C pode ser usada como indicador de óbito em modelo de malária cerebral (WIESE *et al.*, 2008).

A temperatura abaixo de 30°C foi usada para determinar o desfecho em modelo letal de anemia malárica grave. Camundongos A/J infectados por *P. chabaudi* foram avaliados quanto às alterações na temperatura e o limite de temperatura de 30°C teve sensibilidade de 100% para a predição de letalidade. Porém, alguns animais com temperatura abaixo de 30°C não foram considerados clinicamente moribundos, o que pode superestimar a letalidade no modelo de anemia malárica grave (DELLAVALLE *et al.*, 2014). Portanto, a associação de diferentes parâmetros clínicos e comportamentais é importante para que o valor preditivo do ponto final humanitário seja mais preciso e que medidas de suporte possam ser empregadas para o alívio da dor e do desconforto animal.

## 5.4 Toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita intracelular obrigatório com uma gama de hospedeiros extremamente ampla, abrangendo quase todos os animais de sangue quente, incluindo os humanos. É uma zoonose parasitária com distribuição mundial que representa um sério risco para a pecuária e a saúde humana. O *T. gondii* pode ser transmitido horizontalmente, pela ingestão oral de oocistos infecciosos do ambiente e cistos teciduais contidos em carne crua ou mal-cozida, ou verticalmente, pela transmissão transplacentária de taquizoítos.

O *T. gondii* diverge em três linhagens clonais principais, I, II e III, com diferenças marcantes na virulência em camundongos. Os isolados do tipo I são altamente virulentos em camundongos, enquanto os tipos II e III apresentam uma mortalidade dose-dependente (SAEIJ *et al.*, 2006). Embora tradicionalmente seja assumida uma relativa correspondência entre a virulência de cepas de *T. gondii* em camundongos e sua virulência em humanos, existem muitos estudos que apontam diferentes comportamentos do parasita em diferentes hospedeiros.

A via de inoculação e a linhagem dos camundongos podem afetar significativamente a patogênese da infecção. O C57BL/6 se mostrou mais sensível a infecção oral de *T. gondii* de baixa virulência (cepa Me49) e sua mortalidade pode estar associada à necrose grave do intestino. No entanto, a infecção oral em camundongos imunossuprimidos (SCID) induz

a uma infecção assintomática, enquanto os animais infectados pela via intraperitoneal sucumbem mais rapidamente (MEYER *et al.*, 2013). As cepas do tipo RH são agudamente virulentas e letais em todas as linhagens de camundongos de laboratório. Ocasionalmente causam uma infecção aguda que progride rapidamente pela expansão do número de parasitas e disseminação para todos os órgãos do corpo, levando à morte nos primeiros 10-12 dias (WANG, SIBLEY, 2020). A expansão e disseminação do parasita são características proeminentes da infecção aguda, levando ao choque de citocinas, o que causa a morte do animal.

O grau de virulência das cepas de *Toxoplasma* pode ser determinado pelas alterações comportamentais, morbidade, carga parasitária, além de outros parâmetros de infecção não letal, como perda de peso, análise de anticorpos IgG, níveis de haptoglobina no soro e capacidade cistogênica. Devido ao interesse nas alterações comportamentais dos hospedeiros infectados por *T. gondii*, vários autores estudaram o tropismo tecidual no cérebro de roedores infectados e sua relação com as alterações comportamentais nos animais.

Afonso e colaboradores (2012) propuseram que combinações específicas de distribuição de cistos no cérebro podem influenciar mudanças comportamentais específicas (mudanças no risco/medo incondicionado). Além disso, a infecção pode diminuir drasticamente o ato de autolimpeza, principalmente durante a fase aguda da infecção, sendo este considerado um indicador de bem-estar correlacionado com a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

Os sinais clínicos ocasionados pontuados por Arranz-Solis e colaboradores (2015) podem ser empregados no modelo de infecção pela cepa Me49 de *T. gondii* como: pelagem eriçada; arqueamento do dorso; diarreia; conjuntivite; dispneia; perda perceptível de peso ou condição corporal agravada; alteração da temperatura; ascite; e sinais neurológicos/comportamentais como a diminuição da atividade, relutância em se mover, desequilíbrio ao andar, paralisia dos membros posteriores, andar em círculos ou inclinar a cabeça.

No modelo de infecção ocasionado pela cepa RH de *T. gondii*, podem ser observados os seguintes sinais clínicos: perda de peso; taquipneia; dispneia; alteração da temperatura; pelagem eriçada e ascite.

As diferentes vias de infecção do parasito levam a diversas manifestações clínicas nos hospedeiros, e várias dessas formas clínicas são estudadas em modelo murino. O entendimento da virulência nas diversas linhagens de camundongos é extremamente necessário para que o escore de avaliação clínico-comportamental compreenda essas diferenças. A avaliação de proteínas de fase aguda e o uso de métodos de imagem para avaliação dos cistos e do cérebro dos animais podem ser importantes ferramentas complementares para uma melhor predição de morbidade e letalidade.

## 5.5 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica causada pela infecção por *Schistosoma*. Os parasitas residem nas veias mesentéricas, onde depositam centenas de ovos por dia. A patobiologia da esquistossomose hepato-intestinal está principalmente associada a lesões teciduais causadas por ovos migratórios de esquistossomose que não conseguem atingir o lúmen intestinal, ficando presos nos sinusoides hepáticos e na parede intestinal, estimulando a formação de granulomas ricos em colágeno acompanhados de fibrose periportal e hipertensão portal.

O modelo de camundongo infectado por *S. mansoni* oferece uma possibilidade única de avaliar de forma acelerada o desenvolvimento da infecção esquistossomose, que pode levar décadas para se desenvolver em ambientes clínicos (PEREIRA *et al.*, 2016). O tamanho do granuloma em camundongos infectados diminui ao longo do tempo de infecção, levando a uma diminuição da obstrução vascular, resultando na redução do tamanho do órgão e, conseqüentemente, da fisiopatologia. A maioria dos animais de laboratório desenvolve sinais fisiopatológicos como pelos eriçados, diminuição da atividade e eosinofilia acentuada durante os primeiros 2 meses de infecção.

Nono e colaboradores (2021) avaliaram os camundongos infectados por *S. mansoni* diariamente através da aferição do peso e os sinais de dor e distresse. Além desses aspectos, sinais mais específicos também foram relatados, como diarreia, fraqueza, marcha vacilante e comportamento de isolamento. Animais com perda de peso significativa (20%), perda de força ou diarreia com sangue aparente foram submetidos à eutanásia. A ocorrência simultânea de 2 dos 3 sinais relatados acima por 24-42h foi também determinante para a retirada do animal do experimento.

Roedores usados em estudos de longo prazo podem desenvolver uma série de condições clínicas observáveis manifestadas por sinais clínicos, indicando condições irreversíveis que podem causar dor e desconforto aos animais. Esses sinais clínicos e outros parâmetros mensuráveis podem, portanto, servir como ponto final humanitário. Por exemplo, a perda significativa de peso corporal pode indicar comprometimento grave e irreversível do fígado, rim ou outro órgão. O aumento da frequência de pesagem dos animais até o final do estudo tem sido recomendado para aprimorar a detecção de animais com doenças crônicas. Alterações fisiológicas, bioquímicas e outros biomarcadores têm sido sugeridos como desfechos potencialmente mais objetivos e reprodutíveis do que os sinais clínicos.

## 6 | EXEMPLO DE FICHA DE PONTUAÇÃO PARA ESTUDOS EM DOENÇAS PARASITÁRIAS

### a. Ficha 1- Acompanhamento diário

FICHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO				
Nº DO ANIMAL: DATA:	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
<b>ASPECTO</b>				
Peso corporal				
Estado do pelo				
Alteração da temperatura corporal				
Expressão facial				
<b>ALTERAÇÃO COMPORTAMENTAL</b>				
Manuseamento				
<b>LOCOMOÇÃO</b>				
Paralisia de membros				
Postura (arqueamento do corpo)				
Força ao agarrar				
<b>INDICADORES ESPECÍFICOS DOS PROCEDIMENTOS *</b>				
Convulsão				
Coma				
Ascite				
<b>PONTUAÇÃO TOTAL</b>				
Outras observações				
*Preencher com sinais específicos da doença				

### b. Ficha 2: Escore clínico-comportamental

ESCORE CLÍNICO-COMPORTAMENTAL	
ASPECTO	PONTUAÇÃO
<b>PESO CORPORAL</b>	
5-10% de perda de peso	1
11-15% de perda de peso	2
16-20% de perda de peso	3
20% + de perda de peso	E
<b>ESTADO DO PELO</b>	
Ligeira piloereção	1
Piloereção moderada	2
Piloereção intensa	3

<b>ALTERAÇÃO DE TEMPERATURA CORPORAL</b> <b>Faixa normal: 36,5°C (35°C -37,9°C)</b>	
Até 2°C acima da faixa normal	1
Até 3°C acima da faixa normal	2
> 3° da faixa normal	E
Hipotermia < 35°C	E
<b>EXPRESSÃO FACIAL</b>	
Redução da órbita ocular até 50% com ou sem secreção	2
Surgimento de rugas entre a narina e a comissura medial do olho do mesmo lado	3
Rotação das orelhas para fora ou para trás, aumentando o espaço entre elas	3
Quando o formato do globo ocular passar de redondo a elíptico com surgimento de ruga ao redor dos olhos e redução de 50% da área ocular ou mais com ou sem secreção	E
<b>ALTERAÇÃO COMPORTAMENTAL</b>	
Parar de correr	1
Estacionário sem ser provocado	2
Estacionário mesmo provocado	E
<b>PARALISIA DOS MEMBROS</b>	
Paralisia de um membro posterior	2
Paralisia dos 2 membros posteriores	E
Imobilidade > 24 h	E
<b>POSTURA (ARQUEAMENTO DO CORPO)</b>	
Leve	1
Moderado	2
Intenso	3
<b>FORÇA AO AGARRAR</b>	
Perda de 25% da força	1
Perda de 50% da força	2
Perda de 75% da força	3
Perda de 100% da força	E
<b>INDICADORES ESPECÍFICOS DE PROCEDIMENTOS</b>	
Convulsão	E
Coma	E
Ascite	E
<b>Tomar as seguintes ações de acordo com a pontuação total de escores obtidos na tabela acima</b>	
Aumentar a frequência do monitoramento dos animais para 2 vezes ao dia	4
Implementar, se possível, intervenção clínica de cuidados veterinários	5 - 7
Eutanásia	8
Eutanásia - Quaisquer desses parâmetros sozinhos indicam grandes alterações fisiológicas com indicativo de dor e distresse ao animal, levando a intenso sofrimento.	E
<b>PONTUAÇÃO</b>	

## REFERÊNCIAS

- ADAMSON, T. W.; DIAZ-AREVALO, D.; GONZALEZ, T. M.; LIU, X.; KALKUM, M. 2013. Hypothermic endpoint for an intranasal invasive pulmonary aspergillosis mouse model. **Comp Med** 63:477–481.
- AFONSO, C.; PAIXÃO, V. B.; COSTA, R. M. Chronic Toxoplasma infection modifies the structure and the risk of host behavior. **PLoS One**. 2012;7(3):e32489.
- ARRANZ-SOLÍS, D.; AGUADO-MARTÍNEZ, A.; MÜLLER, J.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L. M.; HEMPHILL, A. Dose-dependent effects of experimental infection with the virulent *Neospora caninum* Nc-Spain7 isolate in a pregnant mouse model. **Vet Parasitol**. 2015 Jul 30;211(3-4):133-40.
- BRITO, M. M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N.; RAIBOLT, P. S.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. P.; SCHÄFFER, G. M.; BORBA, C. M. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. **Med Mycol**. 2007 Dec;45(8):721-9.
- BRØNSTAD, A.; NEWCOMER, C. E.; DECELLE, T.; EVERITT, J. I.; GUILLEN, J.; LABER, K. Current concepts of Harm-Benefit Analysis of Animal Experiments - Report from the AALAS-FELASA Working Group on Harm-Benefit Analysis - Part 1. **Lab Anim**. 2016 Jun;50(1 Suppl):1-20.
- CASTILHO, T. M.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; LOZANO, C.; VALDERRAMA, L.; SARAVIA, N. G.; MCMAHON-PRATT, D. Murine model of chronic *L. (Viannia) panamensis* infection: role of IL-13 in disease. **European journal of immunology**. 2010; 40:2816–2829
- COLBY, L. A.; QUENEE, L. E.; ZITZOW, L. A. Considerations for Infectious Disease Research Studies Using Animals. **Comp Med**. 2017 Jun 1;67(3):222-231.
- CORRÊA-MOREIRA, D.; MENEZES, R. C.; ROMEO, O.; BORBA, C. M.; OLIVEIRA, M. M. E. Avaliação Clínica e Anatomopatológica de Modelos Murinos BALB/c Infectados com Isolados de Sete Espécies Patogênicas de *Sporothrix*. **Patógenos**. 2021; 10(12):1647.
- DEANS, C.; WIGMORE, S. J. 2005. Systemic inflammation, cachexia, and prognosis in patients with cancer. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 8:265–269.
- DELLA TERRA, P. P.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; NISHIKAKU, A. S.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. **PLoS Negl. Trop. Dis**. 2017, 11, e0005903.
- DELLAVALLE, B.; KIRCHHOFF, J.; MARETTY, L.; CASTBERG, F. & KURTZHALS, J. (2014). Implementation of minimally invasive and objective humane endpoints in the study of murine *Plasmodium* infections. **Parasitology**, 141(12), 1621-1627.
- DE SEQUEIRA, D. C. M.; MENEZES, R.; OLIVEIRA, M. M. E.; ANTAS, P. R. Z.; DE LUCA, P. M.; DE OLIVEIRA-FERREIRA, J.; BORBA, C. D. M. Experimental Hyalohyphomycosis by *Purpureocillium lilacinum*: Outcome of the Infection in C57BL/6 Murine Models. **Front. Microbiol**. 2017, 8, 1617.
- FUX, C. A.; SHIRTLIFF, M.; STOODLEY, P.; COSTERTON, J. W. 2005. Can laboratory reference strains mirror 'real-world' pathogenesis? **Trends Microbiol** 13:58–63.
- GAVIN, H. E.; SATCHELL, K. J. F. Surface hypothermia predicts murine mortality in the intragastric *Vibrio vulnificus* infection model. **BMC Microbiol** 17, 136 (2017).

GERDTS, V.; LITTEL-VAN DEN HURK, S.; GRIEBEL, P. J.; BABIUK, L. A. Use of animal models in the development of human vaccines. **Future Microbiology** 2007 2:6, 667-675.

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. **J Am Assoc Lab Anim Sci** 52:277–285.

HOMMEL, M.; JAFFE, C. L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 1995;89:55–73.

IKEDA, M.; DE ALMEIDA, J. R. F.; JANNUZZI, G. P.; CRONEMBERGER-ANDRADE, A.; TORRECILHAS, A. C. T.; MORETTI, N. S.; DA CUNHA, J. P. C.; DE ALMEIDA, S. R.; FERREIRA, K. S. Extracellular Vesicles from *Sporothrix brasiliensis* are an Important Virulence Factor that Induce an Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis. **Frontiers in Microbiology**. Vol.9, 2018.

KAO, P. C.; SHIESH, S. C.; WU, T. J. 2006. Serum C-reactive protein as a marker for wellness assessment. **Ann Clin Lab Sci** 36:163–169.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Front Immunol.** 2012;3:251.

LACKNER, P.; BEER, R.; HEUSSLER, V.; GOEBEL, G.; RUDZKI, D.; HELBOK, R.; TANNICH, E.; SCHMUTZHARD, E. (2006), Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, 32: 177-188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2006.00706.x>

LEWIS, M. D.; PAUN, A.; ROMANO, A.; LANGSTON, H.; LANGNER, C. A.; MOORE, I. N.; BOCK, K. W.; FRANCISCO, A. F.; BRENCHLEY, J. M.; SACKS, D. L. Fatal progression of experimental visceral leishmaniasis is associated with intestinal parasitism and secondary infection by commensal bacteria, and is delayed by antibiotic prophylaxis. **PLoS Pathog.** 2020 Apr 13;16(4):e1008456.

MEYER, D. J.; ALLAN, J. E.; BEAMAN, M. H. Effect of route of infection on outcome of *Toxoplasma gondii* infection in hu-PBL SCID mice. **Eur J Microbiol Immunol (Bp)**. 2013 Mar;3(1):28-35.

NIETO, A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J. A.; DE LA FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**. 2011;42(1):39.

NONO, J. K.; MPOTJE, T.; MOSALA, P.; AZIZ, N. A.; MUSAIGWA, F.; HLAKA, L.; SPANGENBERG, T.; BROMBACHER, F. Praziquantel Treatment of *Schistosoma mansoni* Infected Mice Renders Them Less Susceptible to Reinfection. **Front Immunol.** 2021 Dec 10;12:748387.

OLFERT, E. D.; GODSON, D. L. Humane Endpoints for Infectious Disease Animal Models, **ILAR Journal**, Volume 41, Issue 2, 2000, Pages 99–104.

PEREIRA, T. A.; SYN, W. K.; AMÂNCIO, F. F.; CUNHA, P. H.; CAPORALI, J. F.; TRINDADE, G. V.; SANTOS, E. T.; SOUZA, M. M.; ANDRADE, Z. A.; WITEK, R. P.; SECOR, W. E.; PEREIRA, F. E.; LAMBERTUCCI, J. R.; DIEHL, A. M. Osteopontin Is Upregulated in Human and Murine Acute Schistosomiasis *Mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis** (2016) 10:e0005057.

REY, J. A.; TRAVI, B.; VALENCIA, A. Z.; SARAVIA, N. G. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1990; 43:89–193.

RIDKER, P. M. 2007. Inflammatory biomarkers and risks of myocardial infarction, stroke, diabetes, and total mortality: implications for longevity. **Nutr Rev** 65:S253–S259.

ROBLEDO, S. M.; CARRILLO, L. M.; DAZA, A.; RESTREPO, A. M.; MUÑOZ, D. L.; TOBÓN, J.; MURILLO, J. D.; LÓPEZ, A.; RÍOS, C.; MESA, C. V.; UPEGUI, Y. A.; VALENCIA-TOBÓN, A.; MONDRAGÓN-SHEM, K.; RODRÍGUEZ, B.; VÉLEZ, I. D. Cutaneous leishmaniasis in the dorsal skin of hamsters: a useful model for the screening of antileishmanial drugs. **J Vis Exp**. 2012 Apr 21;(62):3533.

SACKS, D. L.; MELBY, P. C. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. **Curr Protoc Immunol**. 2001 May;Chapter 19:Unit 19.2.

SAEIJ, J. P.; BOYLE, J. P.; COLLER, S.; TAYLOR, S.; SIBLEY, L. D.; BROOKE-POWELL, E. T.; AJIOKA, J. W.; BOOTHROYD, J. C. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. **Science**. 2006 Dec 15;314(5806):1780-3.

SANNI, L. A.; FONSECA, L. F.; LANGHORNE, J. Mouse models for erythrocytic-stage malaria. **Methods Mol Med**. 2002;72:57-76.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMAT, MITSUYAMA, M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. **Med Mycol**, 1998, vol. 36 (p. 21-27).

TAKAYAMA-ITO, M.; LIM, C. K.; NAKAMICHI, K.; KAKIUCHI, S.; HORIYA, M.; POSADAS-HERRERA, G.; KURANE, I.; SAIJO, M. Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints. **Biologicals**, 2017, Mar;46:38-45.

TANKERSLEY, C. G.; IRIZARRY, R.; FLANDERS, S. E.; RABOLD, R.; FRANK, R. 2003. Unstable heart rate and temperature regulation predict mortality in AKR/J mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 284:R742–R750.

TOTH, L. A. 2000. Defining the moribund condition as an experimental endpoint for animal research. **ILAR J** 41:72–79.

WANG, Q.; SIBLEY, L. D. Assays for Monitoring *Toxoplasma gondii* Infectivity in the Laboratory Mouse. **Methods Mol Biol**. 2020; 2071:99-116.

WIESE, L.; HEMPEL, C.; PENKOWA, M.; KIRKBY, N.; KURTZHALS, J. A. Recombinant human erythropoietin increases survival and reduces neuronal apoptosis in a murine model of cerebral malaria. **Malar J**. 2008 Jan 7;7:3.