

FLÁVIA DE MOURA PRATES ONG

**AVALIAÇÃO DA INGESTÃO VOLUNTÁRIA DE FORMULAÇÃO GELATINOSA
COMO ALTERNATIVA À GAVAGEM EM ESTUDOS DE CURTA DURAÇÃO EM
ROEDORES**

SÃO PAULO

2024

FLÁVIA DE MOURA PRATES ONG

**AVALIAÇÃO DA INGESTÃO VOLUNTÁRIA DE FORMULAÇÃO GELATINOSA
COMO ALTERNATIVA À GAVAGEM EM ESTUDOS DE CURTA DURAÇÃO EM
ROEDORES**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori (FMVZ-USP)

SÃO PAULO

2024

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo

Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ong, Flávia de Moura Prates

Avaliação da ingestão voluntária de formulação gelatinosa como alternativa à gavagem em estudos de curta duração em roedores / Flávia de Moura Prates Ong ; orientador Claudia Madalena Cabrera Mori .-- São Paulo, 2024.

72 f. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada - Departamento de Patologia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2024.

1. Ingestão voluntária. 2. Formulação gelatinosa. 3. Gavagem. 4. 3 Rs. 5. Bem-estar animal. I. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

O ensaio foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em 08 de dezembro de 2021 (**Protocolo CEUA-FCFN°635 – FCF/USP**)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 077.2021 – CEUA 635

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Ingestão Voluntária como Alternativa à Gavagem em Estudos Sub-Crônicos em Camundongos**”, registrada com o nº **635**, sob a responsabilidade da pesquisadora Sra. Flavia de Moura P. Ong, , que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **03 de dezembro de 2021**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/02/2022 a 01/02/2023
Espécie/Linhagem	Camundongo <i>Mus musculus</i> C57BL/6J
Número de animais	03
Sexo	Macho
Peso/Idade	20 a 25 gramas
Origem	Biotério FCF IQ
Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/02/2022 a 01/02/2023
Espécie/Linhagem	Camundongo <i>Mus musculus</i> C57BL/6J
Número de animais	03
Sexo	Femea
Peso/Idade	20 a 25 gramas
Origem	Biotério FCF IQ
Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/02/2022 a 01/02/2023
Espécie/Linhagem	Camundongo <i>Mus musculus</i> C57BL/6J
Número de animais	32
Sexo	Macho ou Femea
Peso/Idade	20 a 25 gramas
Origem	Biotério FCF IQ

O ensaio foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da USP em 03 de março de 2021 (**Protocolo CEUA-FMVZ/USP N° 5329250422 – FMVZ/USP**).



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 03 de março de 2021
CEUA N 4499030321

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF: [132.193.878-02](#)

Título do projeto: [INGESTÃO VOLUNTÁRIA COMO ALTERNATIVA À GAVAGEM EM ESTUDOS SUB-CRÔNICOS EM CAMUNDONGOS](#)

Responsável: [Cláudia Madalena Cabrera Mori](#)

Equipe: [Flávia de Moura Prates Ong](#)

Telefone: [\(11\)97218-3526](#) e-mail: claudiam@usp.br

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema (<http://orion.fmvz.usp.br/>) por meio da sua senha de acesso.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo

Medicina Veterinária e Zootecnia da USP em 11 de setembro de 2023
(ProtocoloCEUA-FMVZ/USP N° 7714300123 – FMVZ/USP).



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

São Paulo, 11 de setembro de 2023
CEUax N 7714300123

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Claudia Madalena Cabrera Mori

Área: Patologia Experimental E Comparada

Equipe envolvida: Giovanna Dumere Esteves Dos Santos - (executante);

Título da proposta: "INGESTÃO VOLUNTÁRIA COMO ALTERNATIVA À GAVAGEM VISANDO PROMOVER O BEM-ESTAR EM RATOS DE LABORATÓRIO".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, na reunião de 11/09/2023, **ANALISOU** e **APROVOU** a proposta acima referenciada. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da proposta.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão da proposta.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ONG, Flávia de Moura Prates

Título: Avaliação da Ingestão Voluntária de Formulação Gelatinosa como Alternativa à Gavagem em Estudos de Curta Duração em Roedores.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos meus amados Pais, meu esposo e filha que são minha vida, aos meus companheiros do BIOTÉRIO-CEINBIO e orientadora.

AGRADECIMENTOS

Quero aqui registrar toda minha gratidão a Deus pela minha vida, por sempre estar a meu lado nos momentos difíceis e obstáculos que percorri ao longo do caminho.

Agradeço imensamente aos meus pais, João Batista de Moura e Benedita Aparecida de Moura, por todo apoio e dedicação de uma vida inteira, tudo o que conquistei até aqui eu devo a eles.

Ao meu querido e amado esposo, Thomas Prates Ong, pela ajuda, compreensão e apoio constantes neste período turbulento, esta conquista também é sua.

A Ana Luísa de Moura Prates Ong, minha filha querida, por ser o motivo da minha plenitude.

Tenho imensa gratidão por minha orientadora Profa. Cláudia Mori, por ter me incentivado e me aceitado para trilhar essa trajetória.

Sou grata à minha chefe, Silvânia M.P Neves, por toda ajuda, incentivo e compreensão, ao longo da trajetória de três anos de mestrado.

A minha amiga Renata Spalutto Fontes, que me ajudou no desenvolvimento da ideia do mestrado e por sempre estar disponível quando precisei de apoio.

Ao amigo José Galeote, por sua ajuda no desenvolvimento da divisória de acrílico para os camundongos e durante a realização do mestrado como colega de trabalho. Aos amigos Wagner Botelho, Isael Pessoa de Araujo, Eliane de Jesus Santos da Silva, Roseni de Oliveira Santana, Marcelo Lemos Lustosa e Mauriléia de Oliveira Nunes, pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho.

Ao técnico de laboratório Leo Cruz, e ao Especialista de Laboratório Renato Heidor, da FCF-USP, pelo apoio na realização das análises e processamento de sangue e órgãos.

Ao Prof. Eduardo Purgatto, FCF-USP, por nos ter possibilitado a realização da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS), o qual possibilitou o avanço do estudo.

Ao Prof. Fernando Moreno, FCF-USP, por ter gentilmente cedido amostra de esqualeno.

Agradeço também a toda equipe da Prof. Cláudia Mori (FMVZ-USP), em nome de Mariana, Lara, Sandra e Dennis, pela ajuda e apoio com os testes comportamentais e dúvidas surgidas ao longo do caminho.

Agradeço a Giovanna Dumere Esteves dos Santos, graduanda da FMVZ-USP, pela realização dos testes experimentais com os ratos e por todo apoio e contribuição ao trabalho.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

E, por fim, imensa gratidão aos animais de laboratório, que são utilizados há mais de um século em pesquisas biomédicas, cujo valor é incalculável para a sociedade.

EPÍGRAFE

“A partir do momento em que a importância e a forma de se utilizar animais for melhor entendida por todos, esta atividade deixará de ser vista com base nos conceitos previamente estabelecidos de uma prática danosa”

(Vera Peters).

RESUMO

Ong, F.M.P. Avaliação da Ingestão Voluntária de Formulação Gelatinosa como Alternativa à Gavagem em Estudos de Curta Duração em Roedores. 2024. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Considerando que o refinamento dos métodos experimentais é essencial para assegurar o bem-estar animal e obter resultados confiáveis, a ingestão voluntária surge como uma alternativa mais segura e menos estressante para a administração oral em roedores de laboratório. Nesse contexto, este estudo propôs uma abordagem inovadora para a administração de substâncias a camundongos e ratos, empregando a ingestão voluntária por meio de uma formulação gelatinosa palatável e sem calorias como opção à gavagem orogástrica em ensaios de curta duração. O desenho experimental compreendeu dois experimentos, um com camundongos e outro com ratos, com o intuito de comparar as respostas comportamentais e metabólicas entre os grupos de ingestão voluntária e os submetidos à gavagem orogástrica. Inicialmente, conduziu-se um ensaio-piloto para ajustar a formulação gelatinosa, levando em consideração as preferências de sabor e aceitação pelos camundongos. No Experimento 1, com camundongos C57BL/6J, os grupos foram expostos, durante três semanas consecutivas, a uma formulação gelatinosa sabor caramelo, contendo ou não 30µl de esqualeno, em comparação aos grupos submetidos à gavagem. Foram avaliados parâmetros comportamentais e metabólicos. Os camundongos que receberam esqualeno via formulação gelatinosa apresentaram aumento de 2,7 vezes nas concentrações hepáticas do derivado isoprênico em comparação ao grupo controle. Os resultados indicaram uma preferência pela formulação adocicada, sem impacto no ganho de peso, mas com efeitos significativos na redução da ansiedade em testes comportamentais. No Experimento 2, ratos Wistar Kyoto, machos e fêmeas, foram expostos, por cinco dias consecutivos, a uma formulação gelatinosa com sabor bacon, em comparação aos grupos submetidos à gavagem, sendo avaliados os mesmos parâmetros. Ambas as formulações gelatinosas foram bem aceitas pelos animais, que apresentaram menor ansiedade em comparação à gavagem oral. A aceitação positiva da formulação sabor bacon foi evidenciada, sem influência no ganho de peso, mas com impacto na redução dos níveis de ansiedade em testes comportamentais. De maneira geral, os resultados indicaram que as formulações

gelatinosas com sabor caramelo ou bacon são métodos eficazes de ingestão voluntária, reduzindo o estresse em camundongos e ratos. A preferência por sabores variou entre as espécies, com a formulação sabor caramelo mais atrativa para camundongos e a sabor bacon para ratos. A introdução de ambiente enriquecido e treinamento progressivo mostraram-se cruciais para superar a neofobia alimentar e garantir o consumo voluntário. A formulação gelatinosa com sabor caramelo, adoçada com estévia, mostrou-se promissora para administrar esqualeno em camundongos, sem afetar os parâmetros lipídicos. A escolha da estévia, um adoçante sem calorias, foi fundamentada em sua palatabilidade e capacidade de ser consumida pelos camundongos sem impactar significativamente sua dieta. Em síntese, as formulações gelatinosas com sabor caramelo ou bacon representaram métodos éticos e eficazes para promover a ingestão voluntária em estudos com roedores. A busca pela redução do estresse associado à administração de substâncias é crucial para aprimorar o bem-estar animal em pesquisas biomédicas, e a abordagem inovadora deste estudo destaca a importância de considerar o comportamento e as preferências alimentares dos animais.

Palavras-chave: ingestão voluntária, formulação gelatinosa, gavagem, 3 Rs, bem-estar animal

ABSTRACT

Ong, F.M.P. Assessment of Voluntary Intake of Gelatinous Formulation as an Alternative to Gavage in Short-Term Studies in Rodents. 2024. 72 f. Dissertation (Master of Science) — Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, 2024.

Considering that refining experimental methods is essential to ensure animal well-being and obtain reliable results, voluntary intake emerges as a safer and less stressful alternative for oral administration in laboratory rodents. In this context, this study proposed an innovative approach to substance administration in mice and rats, employing voluntary intake through a palatable and calorie-free gelatinous formulation as an option to orogastric gavage in short-term assays. The experimental design comprised two experiments, one with mice and another with rats, aiming to compare behavioral and metabolic responses between voluntary intake groups and those subjected to orogastric gavage. Initially, a pilot trial was conducted to adjust the gelatinous formulation, considering flavor preferences and acceptance by mice. In Experiment 1, with C57BL/6J mice, groups were exposed for three consecutive weeks to a caramel-flavored gelatinous formulation, containing or not 30 μ l of squalene, compared to gavage-subjected groups. Behavioral and metabolic parameters were assessed. Mice receiving squalene via gelatinous formulation showed a 2.7-fold increase in hepatic concentrations of the isoprenic derivative compared to the control group. Results indicated a preference for the sweet formulation, with no impact on weight gain but significant effects on reducing anxiety in behavioral tests. In Experiment 2, Wistar Kyoto rats, both male and female, were exposed for five consecutive days to a bacon-flavored gelatinous formulation, compared to gavage-subjected groups, with the same parameters evaluated. Both gelatinous formulations were well accepted by the animals, showing lower anxiety compared to oral gavage. Positive acceptance of the bacon-flavored formulation was highlighted, with no influence on weight gain but with an impact on reducing anxiety levels in behavioral tests. Overall, the results indicated that caramel or bacon-flavored gelatinous formulations are effective methods for voluntary intake, reducing stress in mice and rats. Flavor preference varied between species, with the caramel flavor being more attractive to mice and the bacon flavor to rats. The introduction of enriched environments and progressive training proved crucial to overcoming food neophobia

and ensuring voluntary consumption. The caramel-flavored gelatinous formulation, sweetened with stevia, showed promise in administering squalene to mice without affecting lipid parameters. The choice of stevia, a calorie-free sweetener, was based on its palatability and ability to be consumed by mice without significantly impacting their diet. In summary, caramel or bacon-flavored gelatinous formulations represented ethical and effective methods for promoting voluntary intake in rodent studies. The pursuit of reducing stress associated with substance administration is crucial for improving animal well-being in biomedical research, and the innovative approach of this study emphasizes the importance of considering animal behavior and food preferences.

Keywords: voluntary intake, gelatinous formulation, gavage, 3 Rs, animal welfare

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 — Imagem representativa de pellets de gelatina, medindo 0,5 cm de diâmetro, que foram oferecidos para os camundongos	31
Figura 02 — Imagem representativa de caixa com camundongos separados por divisória de acrílico e ingerindo o pellet de gelatina	32
Figura 03 – Imagem representativa do protocolo de habituação dos camundongos à ingestão da formulação gelatinosa.....	34
Figura 04 – Imagem representativa do teste comportamental de campo aberto (CA)	35
Figura 05 — Imagem representativa do teste comportamental de labirinto em cruz elevado (LCE)	37
Figura 06 – Curva padrão de esqualeno determinado por cromatografia gasosa com leitura em espectrômetro de massas.....	38
Figura 07 – Imagens representativas de pellets de gelatina, medindo 1 cm de diâmetro, que foram oferecidos para os ratos.....	40
Figura 08 – Imagem ilustrativa de rato manipulando o pellet de gelatina.....	40
Figura 09 – Imagem representativa do teste comportamental de Campo Aberto (CA)	42
Figura 10 — Imagem representativa do teste comportamental de Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	43
Figura 11 - Ganho de peso de camundongos C57BL/6J dos grupos CG, CV, SG e SV. Ausência de diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre os grupos	47
Figura 12 - Parâmetros de atividade geral no campo aberto dos camundongos C57BL/6J dos grupos CG, CV, SG e SV	48
Figura 13 — Atividade exploratória (levantar) e grooming no campo aberto dos camundongos C57BL/6J dos grupos CG, CV, SG e SV	49
Figura 14 - Parâmetros de número de entradas nos braços abertos (NEBA), número de entradas nos braços fechados (NEBF), a distância percorrida e a velocidade média LCE dos camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV	50
Figura 15 - Parâmetros lipídicos séricos de camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV. $n=8$	51
Figura 16 - Ganho de peso de ratos Wistar Kyoto dos grupos G e V, machos e fêmeas.	53

Figura 17 - Parâmetros de atividade geral no campo aberto (CA) de ratos Wistar Kyoto, machos e fêmeas, dos grupos gavagem e gelatina.....	54
Figura 18 - Parâmetros de número de entradas nos braços abertos (NEBA), número de entradas nos braços fechados (NEBF), cruzamento no centro e stretching no LCE dos ratos Wistar Kyoto, machos e fêmeas dos grupos gavagem e gelatina	55
Figura 19 - Glicemia de ratos Wistar Kyoto, machos e fêmeas, dos grupos gavagem e gelatina.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Coeficiente de variação das amostras de parâmetros lipídicos séricos (HDL, LDL, colesterol e triglicerídeos) em camundongos C57BL/6 machos dos grupos CG, CV, SG e SV.....	52
Tabela 02 - Concentrações hepáticas de esqualeno de camundongos C57BL/6 machos dos grupos CG, CV, SG e SV.....	52

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1.	Bem-estar animal durante a pesquisa experimental	20
1.2.	A ingestão voluntária como alternativa à gavagem orogástrica	22
1.3.	Esqualeno como substância-teste administrada via formulação gelatinosa a camundongos	25
2.	OBJETIVOS	27
2.1.	Objetivo geral	27
2.2.	Objetivos específicos	27
3.	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1.	Manejo e alojamento	28
3.1.1.	Experimentos com camundongos	28
3.1.2.	Experimento com ratos	29
3.2.	Ensaio-piloto	29
3.2.1.	Animais	29
3.2.2.	Oferecimento das formulações gelatinosas aos camundongos	31
3.3.	Experimento 1 – Camundongos	33
3.3.1.	Animais	33
3.3.2.	Atividade geral em Campo Aberto	34
3.3.3.	Teste Comportamental do Labirinto em Cruz Elevado	36
3.3.4.	Avaliação de parâmetros metabólicos séricos	37
3.3.5.	Quantificação das concentrações hepáticas de esqualeno	37
3.4.	Experimentos 2 – ratos	39
3.4.1.	Animais	39
3.4.2.	Procedimentos experimentais	39
3.5.	Avaliações comportamentais	41
3.5.1.	Atividade geral em Campo Aberto	41
3.5.2.	Teste Comportamental do Labirinto em Cruz Elevado	42
3.6.	Análise Estatística	44
4.	RESULTADOS	45
4.1.	Ensaio-piloto	45
4.1.1.	Adaptação dos camundongos à formulação gelatinosa – essência bacon	45
4.1.2.	Adaptação dos camundongos à formulação gelatinosa – essência de caramelo	45

4.1.3. Adaptação dos camundongos à gaiola com divisória	45
4.1.4. Adaptação diária dos camundongos à ingestão voluntária.....	46
4.1.5. Padronização da Sala para os Testes Comportamentais.....	46
4.2. Experimento 1	46
4.2.1. Ganho de peso de camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV.....	46
4.2.2. Teste de Comportamento do Campo Aberto (CA) de camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV	47
4.2.3. Teste de Comportamento do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV	50
4.2.4. Parâmetros séricos de camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV	50
4.2.5. Concentrações hepáticas de esqualeno de camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV.....	52
4.3. Experimento 2	53
4.3.1. Ganho de peso dos ratos dos grupos G e V, machos e fêmeas	53
4.3.2. Teste de Campo Aberto (CA) de ratos machos e fêmeas dos grupos gavagem e gelatina	53
4.3.3. Teste de Comportamento – Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de ratos machos e fêmeas dos grupos gavagem e gelatina	54
4.3.4. Glicemia de ratos machos e fêmeas dos grupos gavagem e gelatina.....	55
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bem-estar animal durante a pesquisa experimental

O uso de animais como modelos da anatomia e fisiologia humana remete aos primórdios da medicina. Diferentes médicos e filósofos gregos, incluindo Aristóteles, realizaram vivisseções em animais para melhor compreensão do funcionamento do organismo de humanos (FRANCO, 2013). Desde então, a pesquisa experimental avançou consideravelmente, com o desenvolvimento de diferentes modelos de estudo, que permitiram o entendimento da fisiopatologia de diferentes doenças e, conseqüentemente, melhores formas de sua prevenção e tratamento (PRADILLO et al., 2022; MA, 2023).

Ainda que para a maioria dos gregos antigos, a utilização de animais vivos em experimentos não levantasse questões morais, a partir do século XX verifica-se movimento de maior atenção por parte da sociedade, incluindo comunidade científica, em relação à ética na experimentação animal (ANDERSEN; WINTER, 2019; PETETTA; CICCOCIOPPO, 2021). Em particular, vale a pena destacar o papel de Russel e Burch (1959), que na metade do século passado propuseram o conceito dos 3 R's, em que chamavam a atenção para a necessidade de reduzir (*to reduce*) o número de animais envolvidos na pesquisa; refinar (*to refine*) os procedimentos; e substituir (*to replace*), quando possível, os modelos *in vivo* por métodos alternativos *in vitro*.

No entanto, a adoção em nível global dos princípios dos 3R's tem progredido de maneira lenta (LEWIS, 2019). Agências regulatórias têm se mostrado morosas em integrar métodos *in vitro* em seus protocolos de avaliação de risco químico, por conta de perspectiva conservadora (RIEBLING; LUCH; TRALAU, 2018). O processo de validação de métodos *in vitro* é complexo e caro, o que representa um importante desafio no contexto de substituição de modelos *in vivo* (GRIESINGER et al., 2016). Do ponto de vista do desenvolvimento de fármacos, um dos principais desafios para adoção dos 3Rs é a relativa falta de métodos alternativos que possam fornecer de forma eficiente todas as informações obtidas nos modelos tradicionais em animais (WANGE; BROWN; DAVIS-BRUNO, 2021). Ainda que o conceito dos 3Rs seja bem conhecido entre pesquisadores da área biomédica, parte se mostra resistente a utilizar métodos alternativos (HEREDIA-ANTÚNEZ et al., 2023).

Embora diferentes métodos alternativos tenham sido desenvolvidos nas últimas décadas, como, por exemplo, cultura de organoides, peles artificiais e métodos *in silico* (DUARTE et al., 2023), e o uso de modelos *in vivo* tenha diminuído (FREIRES et al., 2017), o emprego de animais de laboratório continua sendo necessário (FRANCO; KERTON; LEWIA, 2023). O caso recente das vacinas para o Covid-19 é um exemplo de destaque (PANDAMOOZ et al., 2022). Outras áreas em que o uso da experimentação animal faz-se necessário incluem a medicina veterinária, patologia, toxicologia, farmacologia, fisiologia, biomedicina, nutrição, dentre outras. Apesar do Conselho Nacional de Pesquisa Norte-Americano (U.S. National Research Council) prever a eliminação dos modelos *in vivo* em sua visão e estratégia para teste de toxicidade no século 21 (BERG et al., 2011), no cenário atual constata-se que tais modelos deverão ser ainda utilizados em conjunto com métodos *in vitro* (KINTER et al., 2021).

Nesse contexto, de acordo com o pensamento científico atual, é um imperativo ético a manutenção do bem-estar animal na pesquisa experimental (DIAZ, 2020). Dentre os diferentes aspectos que afetam o bem-estar animal na pesquisa biomédica, e que necessitam de melhoria contínua, destacam-se aspectos regulatórios, treinamento dos pesquisadores, produção, cuidado clínico e uso experimental (MARX et al., 2021). Portanto, para angariar a confiança e apoio da população, todo o uso de animais deve ser relevante, feita com competência e de forma responsável e humana (FRANCO et al., 2023).

Animais que vivem em ambientes, nos quais as instalações e práticas são orientadas para a promoção do bem-estar animal, estão menos propensos ao estresse e mais propensos a exibir comportamentos e fisiologia normais à espécie (POOLE, 1997; GARNER et al. 2017). Segundo diretrizes para utilização de animais em pesquisa, a adoção dos princípios dos 3R's tem repercussões positivas, tanto na preservação do bem-estar animal, como robustez e reprodutibilidade dos projetos de pesquisa (RUSSEL&BURCH, 1959).

Segundo o Canadian Council on Animal Care (CCAC; 2019), uma principal fonte de estresse em protocolos de pesquisa envolvendo animais de laboratório, principalmente ratos e camundongos, é a forma pela qual os animais são expostos às substâncias de interesse como fármacos, toxicantes e nutrientes. Ainda de acordo com o CCAC, no âmbito dos princípios dos 3R's, a administração de substâncias requer planejamento cuidadoso para garantir que sejam fornecidas de forma eficaz, e que os impactos negativos no bem-estar dos animais sejam minimizados.

Dado que a maior parte dos medicamentos é consumida oralmente por humanos, a administração por essa via representa método preferencial em estudos experimentais farmacológicos e toxicológicos (CHESLER et al., 2022). Em particular, destaca-se o método de gavagem orogástrica, que permite fornecer a roedores e outras espécies doses controladas de substâncias, de forma eficiente e rápida (MCDONNELL; PETERVARY; CASEBOLT, 2021; TURNER et al., 2012). Outras vantagens deste método, é que permite a administração de diferentes substâncias, de natureza hidro ou lipofílica, ainda, de sabor não palatável.

No método tradicional de gavagem orogástrica, uma cânula metálica com a extremidade esférica é introduzida no esôfago do animal e a substância é administrada diretamente no estômago. Embora apresente precisão na dosagem e no tempo de administração, é uma técnica que requer perfeita contenção, é estressante para os animais e pode causar lesões esofágicas, traumas nas vias aéreas e pulmões, além de possíveis acidentes (NRC, 2011). A gavagem oral pode provocar, ainda, respostas de estresse indesejáveis e é conhecida por alterar a resposta de um animal a agentes farmacológicos (JONES; BOYD; WALLACE, 2016). Além disso, em muitas espécies, incluindo roedores e primatas não humanos, a contenção rígida pode constituir o maior efeito adverso de um procedimento (TURNER et al., 2012). Embora haja a possibilidade do uso de cânulas flexíveis, trata-se, ainda, de método invasivo e o animal pode mastigar pedaços da cânula e os engolir, se a contenção do animal não estiver correta (TURNER et al., 2012.)

1.2. A ingestão voluntária como alternativa à gavagem orogástrica

A técnica de ingestão voluntária, por outro lado, é uma abordagem de refino, que permite a administração repetida de substâncias, sem a necessidade de contenções firmes ou técnicas mais invasivas, minimizando, assim, o estresse nos animais do experimento (TEIXEIRA – SANTOS; ALBINO-TEIXEIRA; PINHO, 2021). Como método não invasivo, permite que o animal ingira voluntariamente a substância de interesse, quando devidamente habituado, apresentando-se como alternativa potencial para a técnica de gavagem orogástrica. As administrações enterais de substâncias de interesse, diretamente na boca, via seringa, ou dieta, água ou outros alimentos, representam exemplos de ingestão voluntária para animais de laboratório (TURNER et al., 2012).

A via oral é econômica, conveniente, relativamente segura e os animais podem ser treinados para cooperar voluntariamente, após um período de habituação à técnica de ingestão voluntária. O método mais simples de administração oral de substâncias é adicioná-las diretamente à ração ou a água dos animais. Entretanto, este método pode modificar o sabor da ração e diminuir o seu consumo, e apresenta a limitação de não se saber a dose exata consumida pelos animais (TURNER et al.,2012).

Um exemplo de ingestão voluntária consistiu na administração guiada por micropipeta de medicamento diluído em solução aquosa de leite condensado (SCARBOROUGH et al.,2020). Mais especificamente, os autores verificaram que os animais consumiram voluntariamente os medicamentos na presença do experimentador, e que potencial saturação ao leite condensado não foi verificada.

Embora muito promissores, são relativamente poucos os estudos que avaliaram a ingestão voluntária como alternativa a outras formas mais invasivas de administração de substâncias. Dentre esses, verifica-se o uso frequente de alimentos altamente palatáveis como Nutella®, que consiste em uma pasta de nozes, altamente calórica, e que apresenta em sua composição uma série de ingredientes como cacau, lecitina de soja e leite em pó (ABELSON et al., 2012; TAYLOR et al., 2016). Outros alimentos incluem mel (KÜSTER et al., 2012), pasta de amendoim (GONZALES et al., 2014), geléia de morango (TEIXEIRA – SANTOS; ALBINO-TEIXEIRA; PINHO, 2021) ou massa de sabor bacon (WALKER et al., 2012).

Alguns estudos têm focado em inovações em sistemas de administração de fármacos, como guloseimas que têm como propósito disfarçar o sabor amargo e odores desagradáveis desse tipo de substâncias. Assim, por exemplo, Nutella® com sabor de chocolate foi veículo útil para ingestão voluntária de elevadas doses de buprenorfina por camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6. Em outro estudo (ATCHA Z et al.,2010), ratos foram treinados na própria gaiola a beber voluntariamente, os medicamentos donepezil e galantamina, para tratamento da doença de Alzheimer, usando uma seringa com água adicionada de 10% de sacarose. De acordo com os autores, os animais aprenderam a consumir todo o líquido da seringa (ATCHA Z et al.,2010).

Ainda que esses alimentos altamente palatáveis tenham sido efetivos como alternativa à gavagem orogástrica, uma limitação que apresentam se refere à possibilidade de que seu consumo possa interferir nos resultados dos experimentos (HUYNH et al.,2016). Assim, por exemplo, verificou-se que o consumo por 14 dias de 500 mg de nutela ou pasta de amendoim, em condições destinadas ao consumo voluntário de losartana por ratos Wistar machos, resultou em aumentos nas concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicerídeos (DIOGO et al., 2015).

Desse modo, para administrações repetidas, deve se ter o cuidado para que o alimento disponibilizado não altere o equilíbrio dietético normal dos animais, em relação à proporção e quantidade de carboidratos, proteínas e lipídios (HUYNH et al.,2016). Nesse sentido, uma forma possivelmente mais efetiva de administração via ingestão voluntária seria aquela representada por formulação gelatinosa saborizada, com menor número de componentes nutricionais e adicionada de aroma (essência) atrativo aos animais, com o propósito de mascarar cheiro e gosto aversivo das substâncias a serem administradas.

Dentre as modalidades de ingestão voluntária, aquelas baseadas em gelatina apresentam vantagens que incluem não apresentar calorias e incluir número reduzido de componentes, evitando influências metabólicas que poderiam interferir no experimento. Nesse sentido, esta modalidade de ingestão voluntária pode ser particularmente interessante em estudos com roedores diabéticos ou obesos (GVAZAVA et al., 2022). Além disso, o custo reduzido e facilidade de manipulação são outros benefícios relacionados ao uso de gelatina (RUVIRA et al., 2023). Entretanto, pouquíssimos estudos de ingestão voluntária investigaram a efetividade de formulações gelatinosas.

O uso de formulação gelatinosa, apenas adocicada e sem sabor, foi utilizada para administrar canabinóides e opióides a camundongos C57BL/6J, por período de 3 semanas consecutivas (ABRAHAM et al., 2020). Mais especificamente, verificou-se que nessas condições houve alívio da dor e aumento das concentrações plasmáticas dessas substâncias, indicando a efetividade da ingestão voluntária (ABRAHAM et al.,2020). Importante destacar que nesse estudo, a administração de gelatina foi feita *ad libitum* e através de dosador de plástico, integrado a circuito eletrônico, desenvolvido pelos autores, que permitia a monitoração do momento do consumo.

O uso de formulação gelatinosa na forma de pellet saborizada com caldo de carne (Maggie®) foi efetivo para a administração do toxicante L-mimosina a ratas Wistar prenhas (DE ALMEIDA et al., 2021). Verificou-se, ainda, em macacos Rhesus perfil farmacocinético equivalente da Rapamicina quando administrada por gavagem oral ou via formulação gelatinosa adocicada com sacarose e sabor laranja (ZHANG et al., 2012).

1.3. Esqualeno como substância-teste administrada via formulação gelatinosa a camundongos

O esqualeno é um triterpeno poliinsaturado, que contém 6 duplas ligações, de fórmula C₃₀H₅₀, intermediário na via de biossíntese do colesterol (SHIMIZU et al., 2019). Recebe esse nome devido à sua ocorrência em elevadas concentrações no óleo de fígado de tubarão. Encontra-se na forma de óleo claro, com cheiro agradável e gosto amargo. Também é encontrado, em menores quantidades, no azeite e nos óleos de palma, gérmen de trigo, amaranto e de farelo de arroz (POPA et al., 2015). A gordura produzida pelas glândulas sebáceas para proteção da pele em humanos contém 13% de esqualeno, representando um dos seus principais componentes (KIM et al., 2012). Em seres humanos, o esqualeno é produzido no fígado (concentração de 75 µg/g) e distribuído, principalmente, para a pele (500 µg/g) e tecido adiposo (300 µg/g), por meio de lipoproteínas de baixa e muita baixa densidade (LDL e VLDL, respectivamente) (POPA et al., 2015). O esqualeno presente no organismo pode ser oriundo de síntese endógeno ou de fontes alimentares (NAZIRI; TSIMIDOU, 2013). A dose oral letal 50 estabelecida para o esqualeno é de 5g/kg/dia (GABÁS et al., 2014). Recentemente, foi confirmada a segurança do seu uso em produtos cosméticos (FIUME et al., 2023).

Efeitos benéficos no metabolismo de colesterol e triglicerídeos por parte do esqualeno foram observados em modelos em roedores, coelhos e suínos (HERRERA et al., 2023). O mecanismo de ação proposto para a redução da síntese hepática de colesterol é similar ao das estatinas e envolveria a inibição da atividade da enzima 3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima A redutase (STRANDBERG et al. 1989).

De acordo com meta-análise recente, dados experimentais reforçam o potencial do esqualeno no contexto da prevenção de doenças cardiovasculares, sendo necessário aumentar o número de estudos clínicos em seres humanos (IBRAHIM et al., 2020). Outros mecanismos protetores do esqualeno no sistema cardiovascular envolvem ações antioxidantes e anti-inflamatórias (MICERA et al., 2020; IBRAHIM et al., 2021).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a viabilidade da ingestão voluntária, por meio de uma formulação gelatinosa palatável e sem calorias, como método alternativo à gavagem em estudos agudos envolvendo roedores de laboratório.

2.2. Objetivos específicos

- a. Desenvolver uma formulação gelatinosa palatável específica para ratos e camundongos;
- b. Verificar a adequação da ingestão voluntária por meio da formulação gelatinosa em camundongos, considerando a administração da substância esqualeno;
- c. Analisar as concentrações plasmáticas de colesterol-HDL, -LDL, total e triglicerídeos, além das concentrações hepáticas de esqualeno, em camundongos que receberam esqualeno por gavagem ou ingestão voluntária (formulação gelatinosa);
- d. Avaliar parâmetros comportamentais em camundongos submetidos à administração de esqualeno por gavagem ou ingestão voluntária (formulação gelatinosa);
- e. Medir os níveis de glicemia em ratos machos e fêmeas que ingeriram a formulação gelatinosa em comparação com aqueles que receberam gavagem;
- f. Analisar parâmetros comportamentais em ratos machos e fêmeas que ingeriram a formulação gelatinosa em comparação com os que receberam gavagem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manejo e alojamento

3.1.1. Experimentos com camundongos

Os experimentos com camundongos (**Ensaio-piloto e Experimento 1**) foram aprovados pelas Comissões de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP em 03 de março de 2021 (Protocolo CEUA-FMVZ/USP N° 5329250422 — FMVZ/USP) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em 08 de dezembro de 2021 (Protocolo CEUA-FCF N°635 — FCF/USP).

Os camundongos foram alojados em sistema *open cage*, constituído por gaiolas abertas de polipropileno, nas medidas 30 cm de comprimento por 20 cm de largura por 13 cm de altura, com cama de maravalha de Aspen autoclavada e enriquecimento ambiental com rolos de papelão (Relax). Durante todo o período experimental, os animais receberam água filtrada e autoclavada e ração comercial irradiada, da marca Nuvilab CR1® (QUIMTIA SA, Curitiba, Brasil), em regime “ad libitum”.

As condições ambientais (macroambiente) do Biotério de Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP foram mantidas pelo sistema de ar condicionado central, que oferece ventilação e condicionamento do ar em temperatura e umidade relativa constantes. A sala experimental dos animais foi mantida em temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa (UR) de $55\pm 10\%$. Foram realizadas cerca de 20 trocas de ar por hora, para renovação de 100% do ar da sala. Os registros de temperatura e umidade (UR) da sala foram realizados diariamente no período da manhã e tarde. Os animais foram mantidos em foto período de 12h claro por 12h escuro, controlado por um temporizador digital na sala experimental. O período claro iniciava-se às 7h, e o de escuro, às 19h.

3.1.2. Experimento com ratos

O **Experimento 2** com ratos foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (CEUA FMVZ/USP no 1362120819 e CEUA no 7714300123).

Os ratos foram alojados em sistema *open cage*, constituído por gaiolas abertas de polipropileno com tampa alta em aço inox, nas medidas 41 cm de comprimento por 34 cm de largura por 21,6 cm de altura (Beiramar®, São Paulo, Brasil), com cama de maravalha de flocos de pinus autoclavada (J. R. Maravalha Comercio de Serragens LTDA, São Paulo, Brasil) e enriquecimento ambiental com rolos de papelão (Relax — Granja RG, São Paulo, Brasil). A cama era trocada duas vezes por semana para evitar o excesso de umidade e amônia. Durante todo o período experimental, os animais receberam água filtrada e autoclavada e ração comercial irradiada, da marca Nuvilab CR1® (QUIMTIA SA, Curitiba, Brasil), em regime “ad libitum”.

As condições ambientais (macroambiente) do Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP foram mantidas pelo sistema de ar-condicionado central, que oferece ventilação e condicionamento do ar em temperatura e umidade relativa constantes. A sala experimental dos animais foi mantida em temperatura de 22 ± 2 °C e umidade relativa (UR) de 55 ± 10 %. Foram realizadas cerca de 20 trocas de ar por hora, para renovação de 100% do ar da sala. Os registros de temperatura e umidade (UR) da sala foram realizados diariamente no período da manhã e tarde. Os ratos foram mantidos em fotoperíodo de 12h claro por 12h escuro, controlado por um temporizador digital na sala experimental. O período claro iniciava-se às 6h, e o de escuro, às 18 h.

3.2. Ensaio-piloto

3.2.1. Animais

Inicialmente foi conduzido o ensaio-piloto com camundongos para padronização do método de ingestão voluntária. Esta etapa envolveu a definição dos aspectos farmacotécnicos da formulação gelatinosa, bem como dos operacionais referentes ao seu oferecimento aos camundongos.

Além disso, foram analisados a composição ideal da formulação gelatinosa, os sabores mais aceitos pelos camundongos e o tempo de ingestão. Também foram realizados ajustes dos aparelhos de análises bioquímicas e testes comportamentais.

No Ensaio-piloto foram utilizados camundongos (*Mus musculus domesticus*) da linhagem isogênica C57BL/6J, de padrão sanitário SPF (Livres de organismos patogênicos especificados) com oito semanas de idade (adulto), provenientes do

Centro de Investigação em Biomodelos da FCF-IQ/USP. A quantidade total de animais utilizados foi de 3 camundongos C57BL/6J machos e 3 fêmeas. Foram

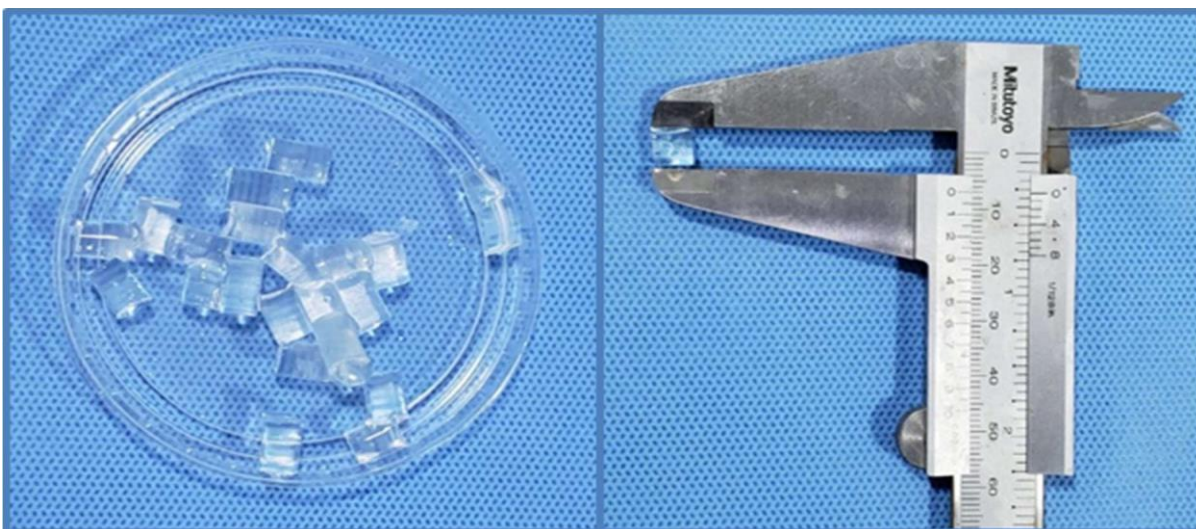
elaboradas

duas formulações gelatinosas, baseadas em sabor de bacon ou caramelo.

Para a formulação gelatinosa sabor bacon, foi dissolvido 1g de ágar-ágar (Casa Forte, São Paulo, Brasil) em 120 mL de água fria. Em seguida, a solução ágar-ágar em água foi fervida por 5 min. Em seguida, foi retirada do fogo e adicionada de 5 gotas de essência de bacon (Arcolor, São Paulo, Brasil). A solução foi misturada, esfriada e adicionada na quantidade de 0,20 mL a microplacas de 0,20 mL. A microplaca foi colocada em geladeira a 4°C

Para a formulação gelatinosa adocicada, foi dissolvido 1g de ágar-ágar (Casa Forte, São Paulo, Brasil) em 60 mL de água fria. Em seguida, a solução ágar-ágar em água foi fervida por 5 min. Em seguida, foram adicionados a esta solução de ágar-ágar, 60 mL de solução aquosa contendo 1 g de adoçante stevia (zero açúcares, zero lactose e zero calorias; Stevita, Maringá, Brasil). A nova solução foi misturada e fervida por 2 min. Em seguida, foi retirada do fogo e adicionada de 5 gotas de essência de caramelo (Arcolor, São Paulo, Brasil). A solução foi misturada, esfriada e adicionada na quantidade de 0,20 mL a microplacas de 0,20 mL. A microplaca foi colocada em geladeira a 4°C por uma noite. No dia seguinte, os pellets de gelatina foram retirados da micro-placa (Figura 1).

Figura 01 – Imagem representativa de pellets de gelatina, medindo 0,5 cm de diâmetro, que foram oferecidos para os camundongos



Fonte: Ong, F.M.P. (2024)

3.2.2. Oferecimento das formulações gelatinosas aos camundongos

A formulação gelatinosa à base de ágar-ágar e essência de bacon foi utilizada, inicialmente, para avaliar a efetividade da ingestão voluntária em camundongos machos e fêmeas do ensaio piloto.

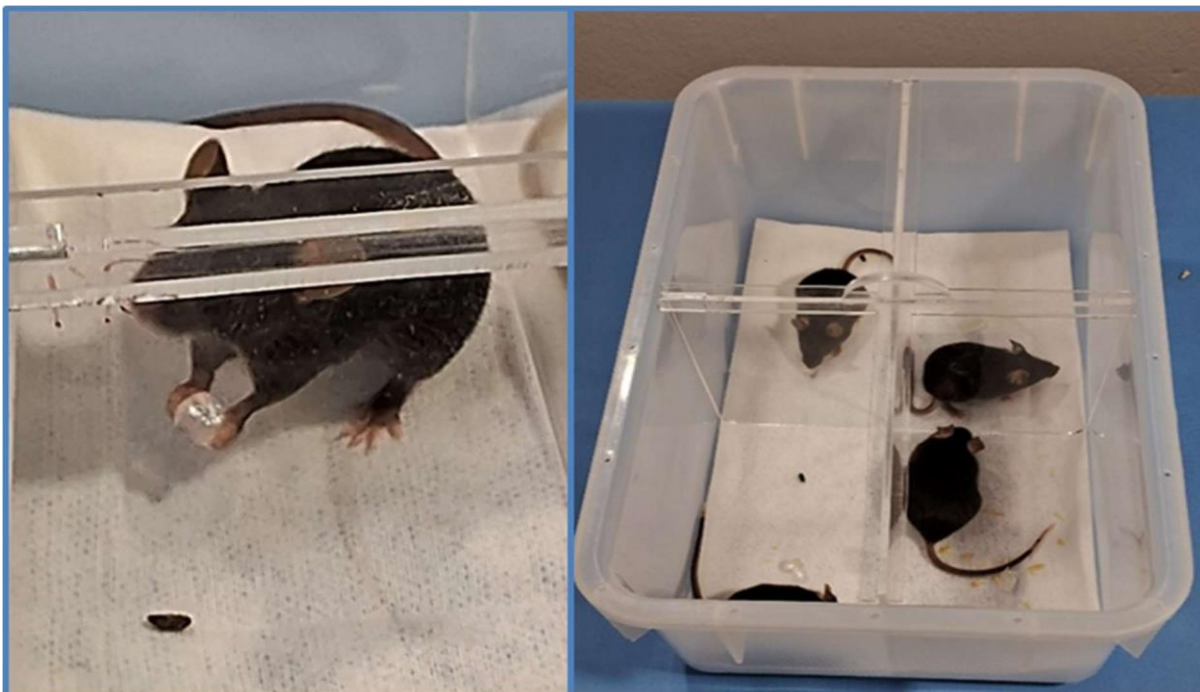
Nesse caso, para verificar a aceitação do referido sabor, a formulação gelatinosa foi colocada diretamente na gaiola com os quatro animais, sem a inserção de divisória. Esse procedimento foi repetido por 3 dias consecutivos, no horário das 13hs, e foi feita a verificação da ingestão por 1 hora. A formulação gelatinosa com sabor doce (caramelo) foi testada, em outros dias, nessas mesmas condições. Esta formulação foi mais bem aceita pelos animais.

A formulação gelatinosa doce foi, então, oferecida aos animais que foram mantidos em gaiola com a divisória. Para esse teste, foi utilizada uma gaiola com papel absorvente, em que foi inserida divisória de acrílico transparente em forma de cruz, sendo colocado cada animal da gaiola em um quadrante (Figura 2). Tal divisória é relevante para garantir que cada animal ingeriu toda a substância, sem a necessidade de deixar os animais completamente isolados na gaiola. Para habituação dos animais à divisória, no primeiro e segundo dia, os mesmos ficaram na gaiola por 3 e 5 minutos, respectivamente, e não receberam a gelatina. Já no terceiro dia, ficaram na gaiola com divisória por 5 minutos e receberam a formulação gelatinosa de escolha.

No teste seguinte, os camundongos machos e fêmeas foram colocados nas gaiolas com divisórias, juntamente com a formulação gelatinosa doce adicionada de esqualeno (99%, Sigma-Aldrich, Saint Louis, E.U.A.), e deixados, por no máximo 10 minutos. Foi feita a verificação da quantidade ingerida por cada animal. Esse teste foi realizado no período da tarde, das 13 às 14hs, sem período de jejum.

Os camundongos machos e fêmeas do ensaio piloto também foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto e labirinto em cruz elevado, para padronização da sala de comportamento, posição da câmera e logística no momento do teste. Ao final dos testes, os animais foram submetidos à eutanásia pelo método de exsanguinação por punção cardíaca sob anestesia (isoflurano), amostras de sangue e fígado foram coletadas. As amostras de sangue (aproximadamente 1 mL cada) foram centrifugadas (Thermo ST 16R, Ann Arbor, E.U.A.) a 4°C por 10 min e 1000 g. O sobrenadante (aproximadamente 500 uL de plasma) foi coletado com micropipeta, transferido para microtubo e armazenado em freezer -80°C até uso.

Figura 02 – Imagem representativa de caixa com camundongos separados por divisória de acrílico e ingerindo o pellet de gelatina



Fonte: Ong, F.M.P. (2024)

3.3. Experimento 1 – Camundongos

3.3.1. Animais

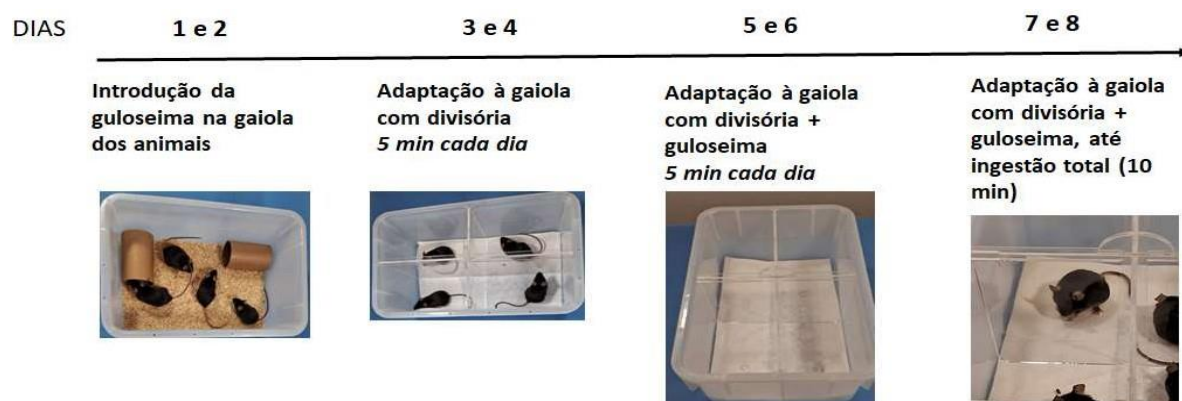
O experimento 1 foi conduzido em camundongos machos com 6 semanas de idade e foi dividido em 2 etapas (A e B), com 16 animais cada. Em ambas as etapas, os animais foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos com 4 animais cada:

- a) **Grupo Controle Gavagem (CG):** os animais receberam diariamente 100 uL de água por gavagem, durante 3 semanas;
- b) **Grupo esqualeno Gavagem (SG):** os animais receberam diariamente 30 uL de esqualeno em 70 uL de água por gavagem, durante 3 semanas;
- c) **Grupo Controle Ingestão Voluntária (CV):** os animais receberam diariamente por ingestão voluntária a formulação gelatinosa doce, durante 3 semanas;
- d) **Grupo esqualeno Ingestão Voluntária (SV):** os animais receberam diariamente por ingestão voluntária a formulação gelatinosa doce contendo 30 uL de esqualeno, durante 3 semanas.

Inicialmente, foi promovido período de adaptação dos animais à formulação gelatinosa (Figura 3). Nos primeiros 2 dias, foi inserida formulação gelatinosa doce nas gaiolas dos animais dos grupos CV e SV, sem a divisória. Nos 2 dias subsequentes, os animais foram adaptados à gaiola com divisórias, que foram mantidas por 5 minutos em cada dia. Nos 2 dias seguintes, os animais foram alocados na gaiola com divisória mais a formulação gelatinosa veículo, sem esqualeno, tendo sido o período de 5 minutos para cada dia. Na segunda semana de adaptação, os animais dos grupos ingestão voluntária foram colocados na gaiola com divisória+formulação gelatinosa, e deixados pelo período de 10 minutos, até a total ingestão do composto gelatinoso.

Após duas semanas de adaptação, foram iniciadas as administrações por gavagem do veículo água ou esqualeno, bem como a ingestão voluntária da formulação gelatinosa doce ou da formulação gelatinosa com ingestão voluntária esqualeno.

Figura 03 – Imagem representativa do protocolo de habituação dos camundongos a ingestão da formulação gelatinosa



Fonte: Ong, F.M.P. (2024)

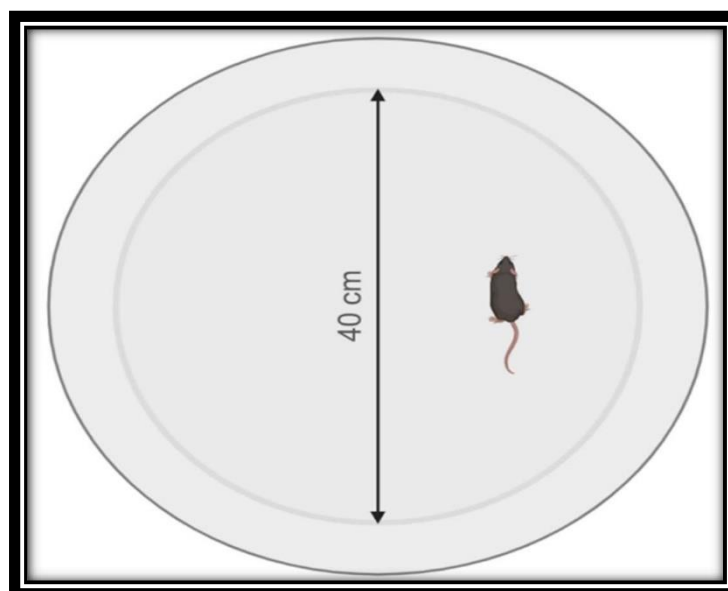
Ao final da segunda semana de tratamento, os animais dos 4 grupos foram submetidos ao teste comportamental de campo aberto e ao final da terceira semana de tratamento, foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado. No dia seguinte ao teste de labirinto em cruz elevado, os animais foram submetidos à eutanasiados pelo método de exsanguinação por punção cardíaca sob anestesia geral (isoflurano) e realizada a coleta de sangue e do fígado. Os camundongos dos diferentes grupos foram anestesiados com 4% de isoflurano na indução da anestesia inalatória e 3% de isoflurano na manutenção na máscara (IMPAC6 VetEquip Inc., Pleasanton, EUA). Coletou-se 1 ml de sangue de cada animal, pelo método de punção cardíaca, com seringa adicionada de anticoagulante (0,02ml de EDTA), para posterior centrifugação, e armazenamento do plasma em freezer -80°C. O fígado de cada animal foi coletado, embrulhado em papel alumínio identificado com o nome dos grupos e armazenado em freezer -80°C para posterior processamento.

3.3.2. Atividade geral em Campo Aberto

Atividade geral dos camundongos em campo aberto foi avaliada com o objetivo de caracterizar de forma quantitativa e qualitativa parâmetros exploratórios e motores em um ambiente novo (TATEM et al., 2014).

Os testes foram conduzidos entre as 09:00 e 11:00 hs pelo mesmo observador. A arena de campo aberto, com um diâmetro de 40 cm e altura de 31 cm em fundo branco, foi posicionada em uma sala experimental do biotério da FCF-IQ/USP com isolamento acústico e iluminada por uma fonte de luz artificial indireta e suave (aproximadamente 106 lumens ao nível da arena) (Figura 4). A câmera foi estrategicamente posicionada para abranger todo o espaço da arena (com um ângulo de 90° em relação à base), e tanto o posicionamento quanto o zoom da câmera permaneceram consistentes em todas as sessões. A arena foi cuidadosamente limpa com uma solução de álcool/água a 5% entre cada teste com camundongo, visando minimizar possíveis pistas de odor. Camundongos de diferentes grupos foram alternadamente testados ao longo dos ensaios. Um camundongo de cada vez foi colocado no centro da arena, e seu comportamento espontâneo foi registrado por 10 minutos usando uma câmera de vídeo JVC Everio HDD (JVC Kenwood do Brasil Comércio de Eletrônicos Ltda, São Paulo, Brasil).

Figura 04 – Imagem representativa do teste comportamental de campo aberto (CA)



Fonte: Ong, F.M.P. (2024)

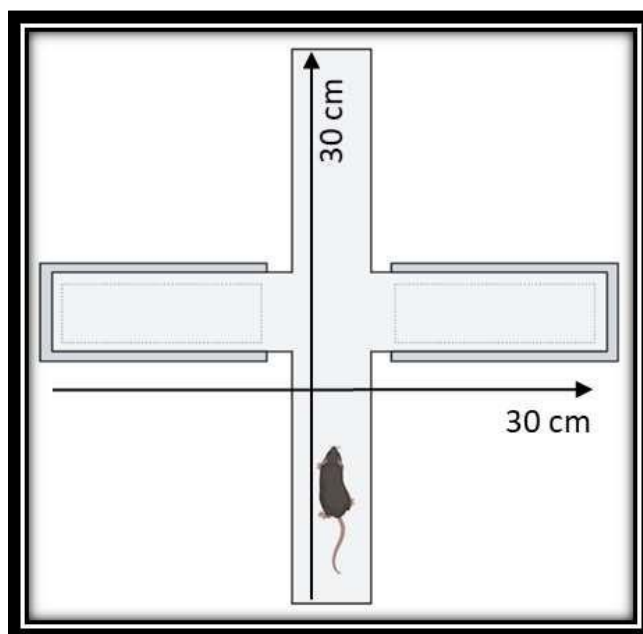
Posteriormente, os vídeos foram analisados usando o programa Ethovision XT versão 15.0.1416 (Noldus Information Technology, Wageningen, Países Baixos) para medir a distância percorrida (cm), velocidade média (cm/s), tempo em movimento (s) e tempo gasto na periferia/centro da arena (s).

As frequências de levantar (quando o animal eleva os membros torácicos se apoiando apenas nos membros pélvicos) e de grooming (autolimpeza) foram manualmente analisadas por um único indivíduo.

3.3.3. Teste Comportamental do Labirinto em Cruz Elevado

O teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é utilizado para avaliação da ansiedade em camundongos frente a um espaço aberto (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008). Os testes foram conduzidos entre as 09:00 e 11:00hs pelo mesmo observador. O aparato consiste em um labirinto feito de madeira com revestimento de tinta óleo cinza escuro, e possui dois braços abertos (30cm de comprimento, 5cm de largura e 0,5 cm de altura) e dois braços fechados com paredes laterais (30cm x 5cm x 16cm), com uma plataforma central medindo 5cm x 5cm x 0,5cm. Os braços abertos e fechados, elevados 50 cm do solo, cruzam-se perpendicularmente formando uma cruz. O LCE foi posicionado em uma sala experimental do biotério da FCF-IQ/USP com isolamento acústico e iluminada por uma fonte de luz artificial indireta e suave (aproximadamente 106 lumens ao nível do aparato (Figura 5). A câmera foi estrategicamente posicionada para abranger todo o espaço do labirinto (com um ângulo de 90° em relação à base), e tanto o posicionamento quanto o zoom da câmera permaneceram consistentes em todas as sessões. O aparato foi cuidadosamente limpo com uma solução de álcool/água a 5% entre cada teste com camundongo, visando minimizar possíveis pistas de odor. O teste foi realizado de forma intercalada, sendo analisados sempre um animal do grupo controle, seguido por um do grupo experimental. Cada camundongo foi posicionado na plataforma central de frente para um dos braços fechados e observado durante 5 minutos, na ausência do operador na sala de teste. Ao fim do teste, a câmera era desligada e o animal devolvido a uma gaiola, separada dos demais animais que ainda não haviam passado pelo teste. Os comportamentos registrados foram: número de entradas nos braços abertos, número de entradas nos braços fechados e distância percorrida.

Figura 05 – Imagem representativa do teste comportamental de labirinto em cruz elevado (LCE)



Fonte: Ong, F.M.P. (2024).

3.3.4. Avaliação de parâmetros metabólicos séricos

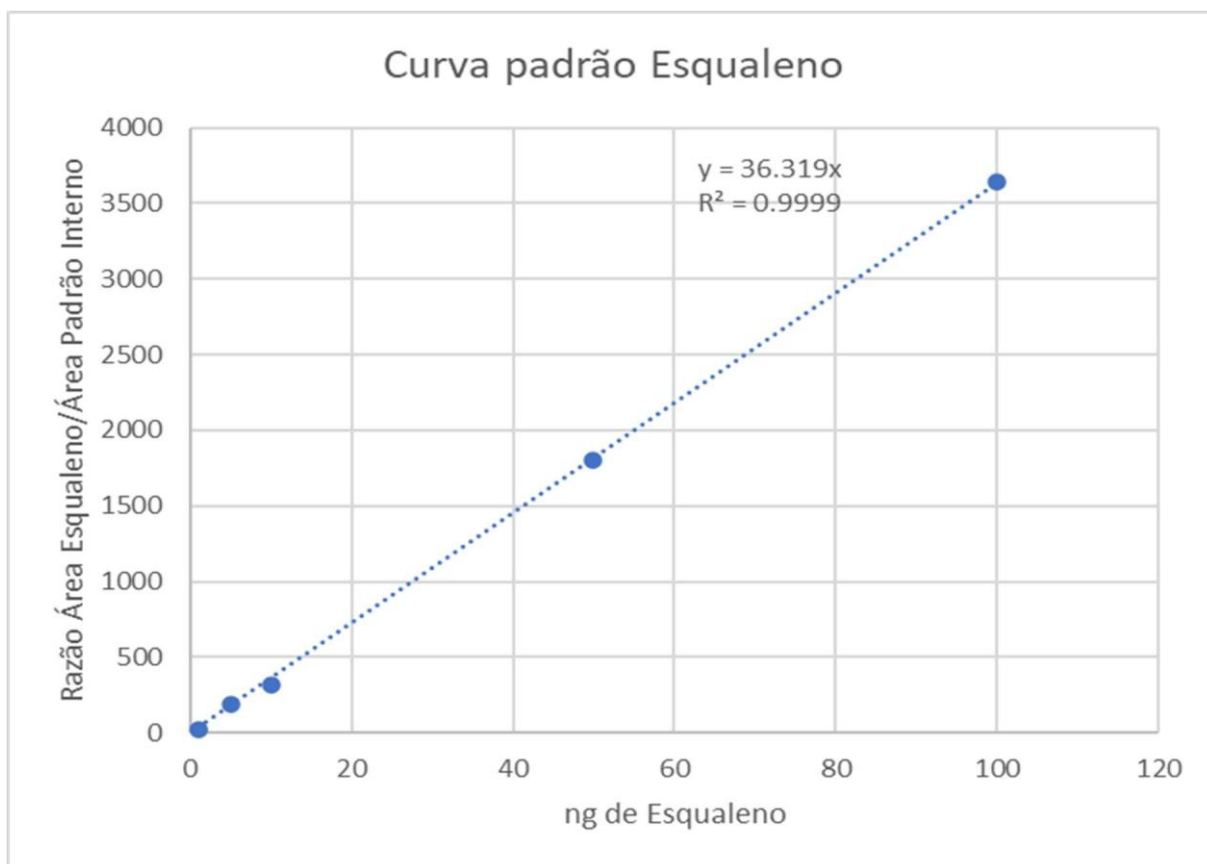
Para determinação das concentrações plasmáticas de colesterol-HDL (lipoproteínas de alta densidade), -LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e total, e triglicérides, foram utilizados 200ul de plasma em triplicata para determinação em uniplicata, em Analisador Bioquímico Automático Labmax 240 (Tokyo Boeki Machinery LTD, Tóquio, Japão), seguindo as instruções de uso do fabricante (LabtestDiagnóstica S/A). Para o controle de qualidade do método forma utilizados o materialcalibrador Calibra H Ref. 80 (lote 202101; Expiração 17/09/2024) e controles Qualitrol1H Ref. 71 (lote 202102; Expiração 13/09/2024) e Qualitrol 2H Ref. 72 (lote 202102; Expiração 13/09/2024).

3.3.5. Quantificação das concentrações hepáticas de esqualeno

A determinação das concentrações de esqualeno foi realizada de acordo com Su e colaboradores (2004) e Cardozo e colaboradores (2011), com algumas modificações.

As amostras foram homogeneizadas em 500 μL de etanol com adição de 15 ng de α -colestano (padrão interno; >97%, Sigma-Aldrich, Saint Louis, E.U.A.), utilizando aparelho tipo Potter. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000 g e a 4 $^{\circ}\text{C}$. Os sobrenadantes foram transferidos para *vials* de injeção, sendo que 1 μL foi injetado em cromatógrafo à gás (Agilent modelo 7890, Santa Clara, E.U.A.), acoplado a detector seletivo de massas (Agilent modelo 5977; Santa Clara, E.U.A.). As condições utilizadas foram: coluna Agilent DB-5MS (30 mts, 0.25 mm diâmetro interno, 0.25 μm espessura de filme; Santa Clara, E.U.A.); injeções a 200 $^{\circ}\text{C}$ em modo splitless; gás de arraste hélio (1 mL/minuto); corrida programada: inicial 150 $^{\circ}\text{C}$, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 250 $^{\circ}\text{C}$, manutenção por 2 min, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 35 $^{\circ}\text{C}$, manutenção por 2 min. Para o esqualeno, foram monitorados os íons em m/z 69 e 81. Os resultados foram calculados a partir de curva de calibração de esqualeno (Figura 6).

Figura 06 – Curva padrão de esqualeno determinado por cromatografia gasosa com leitura em espectrômetro de massas



Padrão interno: α -colestano.

3.4. Experimentos 2 – ratos

3.4.1. Animais

O experimento 2 foi conduzido em 30 ratos Wistar Kyoto, sendo 15 machos e 15 fêmeas, provenientes do Biotério de Produção de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVZ/USP) no Campus São Paulo. Os animais tinham entre 6 e 7 meses e foram previamente utilizados para aulas práticas da disciplina Ciência de Animais de Laboratório — VPT2203. Dessa forma, estavam adaptados ao manejo e contenção.

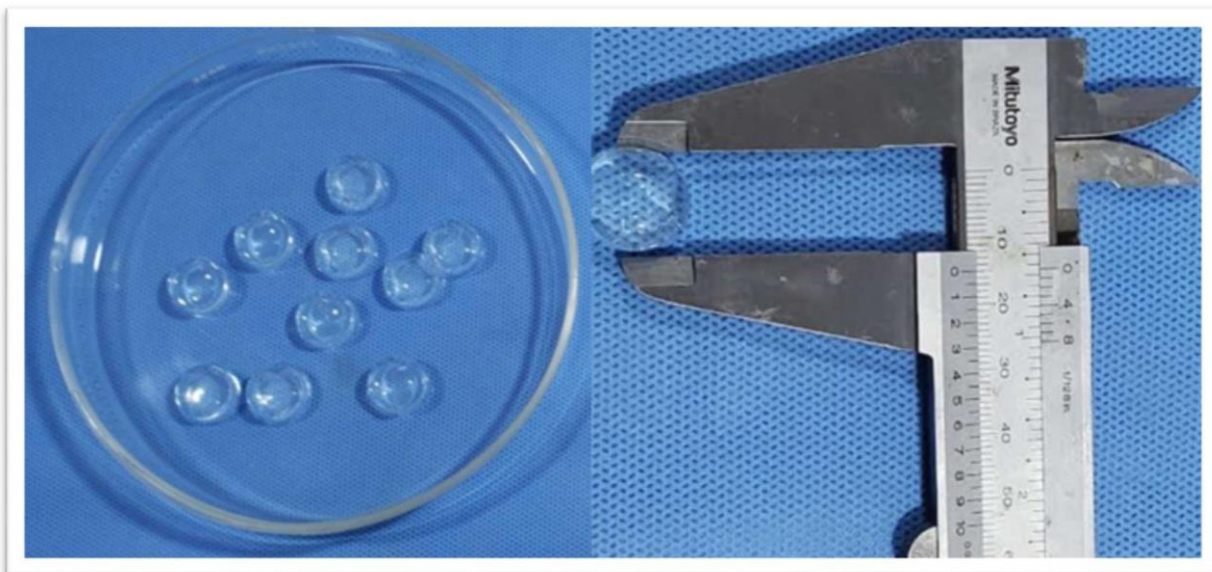
3.4.2. Procedimentos experimentais

Os animais foram submetidos a período inicial de adaptação de 1 semana, de modo a habitua-los à contenção, manipulação e introdução à cânula e à formulação gelatinosa. Esses procedimentos ocorreram entre 9:00 e 11:00 hs, para evitar influência do ciclo circadiano nos resultados. Então, os ratos machos foram distribuídos em dois grupos, com 5 animais cada, que receberam gavagem ou a formulação gelatinosa diariamente e por 5 dias consecutivos. Após esse período, foi realizado o mesmo procedimento com 10 fêmeas. E, por fim, foram constituídos 2 grupos mistos que receberam por 5 dias consecutivos gavagem (2 fêmeas e 2 machos) ou a formulação gelatinosa (3 fêmeas e 3 machos).

No caso da gavagem, o animal a ser submetido a este procedimento foi transportado individualmente para uma sala isolada, de modo a diminuir o estresse dos animais remanescentes. Foi oferecido 1 mL/animal de solução pré-preparada de solução fisiológica com essência artificial de bacon.

Para ingestão voluntária, como cada gaiola continha 3 indivíduos, o marcado com número 3 foi transferido para a gaiola de transporte, enquanto os outros dois permaneceram na gaiola de origem, separados por 1 divisória. A formulação gelatinosa (Figura 7 e 8), que apresentava também o volume de 1 ml, foi formulada com ágar-ágar, água e essência artificial de bacon, de acordo com o descrito para os camundongos. Esta foi colocada sobre a grade da gaiola simultaneamente para os dois ratos.

Figura 07 – Imagens representativas de pellets de gelatina, medindo 1 cm de diâmetro, que foram oferecidos para os ratos



Fonte: Ong, F.M.P. (2024)

Figura 08 – Imagem ilustrativa de rato manipulando o pellet de gelatina



Fonte: Ong, F.M.P. (2024)

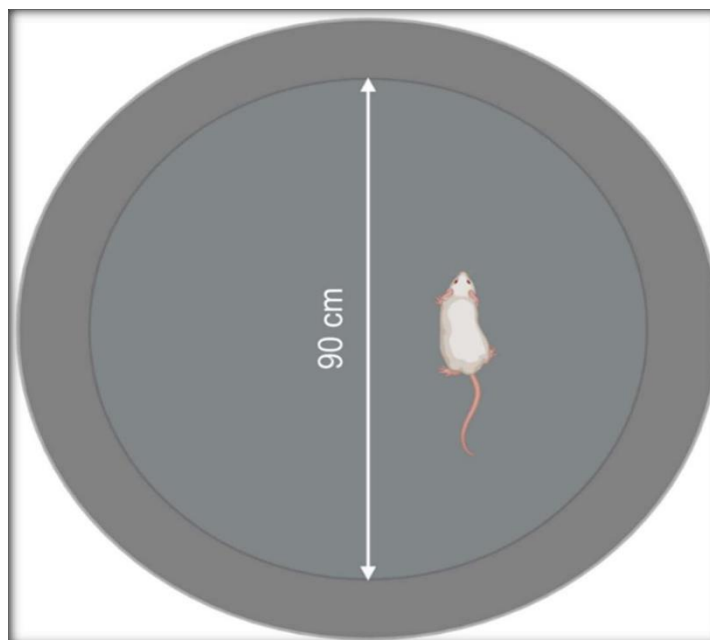
3.5. Avaliações comportamentais

Para a realização dos testes comportamentais, todos os animais foram transferidos para o laboratório de estudos comportamentais que continha 3 salas distintas: a sala de espera, a sala com o campo aberto e a sala com o labirinto em cruz elevado. Os animais foram submetidos ao teste de Campo Aberto (CA) no 4º dia de experimento e ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE) ao 5º dia e último dia de experimentação. Ao final do procedimento, foi medida a glicemia de cada indivíduo, seguindo a ordem de cada grupo. O procedimento foi feito com o transporte individual de cada animal para uma mesa de procedimento e o rato foi colocado em um pano macio, contido e coberto com um pano de modo que apenas sua cauda ficasse para fora, visando facilitar a coleta de sangue e diminuir estímulos sonoros e visuais. Com uma agulha de insulina individual, foi coletado sangue da veia caudal e mensurado o nível de glicose com o aparelho Accu Chek.

3.5.1. Atividade geral em Campo Aberto

Atividade geral dos ratos em campo aberto foi avaliada com o objetivo de caracterizar de forma quantitativa e qualitativa parâmetros exploratórios e motores em um ambiente novo (TATEM et al., 2014). Os testes foram conduzidos entre as 08:00 e as 10:00 hs pelo mesmo observador. A arena de campo aberto, com um diâmetro de 90 cm e altura de 28 cm, pintada em cinza escuro fosco com revestimento acrílico lavável, foi posicionada em uma sala experimental do biotério da FMVZ/USP (Figura 9). A câmera foi estrategicamente posicionada para abranger todo o espaço da arena (com um ângulo de 90º em relação à base), e tanto o posicionamento quanto o zoom da câmera permaneceram consistentes em todas as sessões. A arena foi cuidadosamente limpa com uma solução de álcool/água a 5% entre cada teste com rato, visando minimizar possíveis pistas de odor. Ratos de diferentes grupos foram alternadamente testados ao longo dos ensaios. Um rato foi colocado de cada vez no centro da arena, e seu comportamento espontâneo foi registrado por 10 minutos usando uma câmera de vídeo JVC Everio HDD (JVC Kenwood do Brasil Comércio de Eletrônicos Ltda, São Paulo, Brasil).

Figura 09 – Imagem representativa do teste comportamental de Campo Aberto (CA)



Fonte: Ong, F.M.P. (2024)

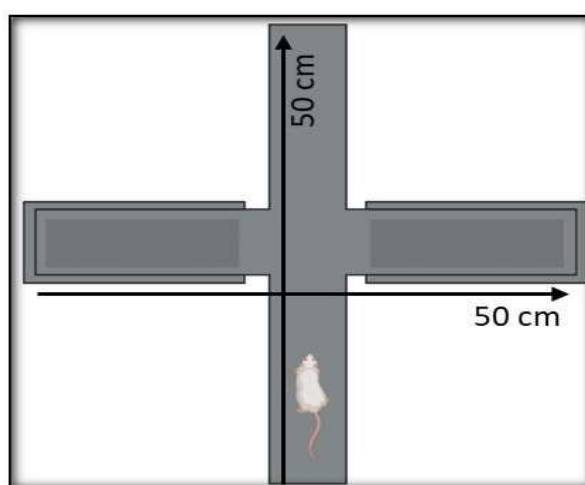
Posteriormente, os vídeos foram analisados usando o programa Ethovision XT versão 15.0.1416 (Noldus Information Technology, Países Baixos) para medir a tempo em segundos em que o animal percorreu a arena do campo aberto, tempo de locomoção, distância percorrida (cm), velocidade média (cm/s), frequência de levantar, frequência e tempo de grooming (autolimpeza). As frequências de levantar (quando o animal eleva os membros torácicos se apoiando apenas nos membros pélvicos) e de grooming (autolimpeza) foram manualmente analisadas por um único indivíduo.

3.5.2. Teste Comportamental do Labirinto em Cruz Elevado

O teste do LCE é utilizado para avaliação da ansiedade em ratos frente a um espaço aberto (KOMADA ET AL., 2008). Os testes foram conduzidos entre as 08:00 e 10:00 hs pelo mesmo observador. O aparato consistiu em um labirinto feito de madeira com revestimento de tinta cinza escuro fosco, e possui dois braços abertos 50cm de comprimento e 10cm de largura) e dois braços fechados com paredes laterais (50 x 10 x 40 cm), com uma plataforma central medindo 10cm x 10cm.

Os braços abertos e fechados, elevados 50 cm do solo, cruzam-se perpendicularmente formando uma cruz (Figura 10). O LCE foi posicionado em uma sala experimental do biotério da FMVZ-USP. A câmera foi estrategicamente posicionada para abranger todo o espaço do labirinto (com um ângulo de 90° em relação à base), e tanto o posicionamento quanto o zoom da câmera permaneceram consistentes em todas as sessões. O aparato foi cuidadosamente limpo com uma solução de álcool/água a 5% entre cada teste com rato, visando minimizar possíveis pistas de odor. O teste foi realizado de forma intercalada, sendo analisados sempre um animal do grupo controle, seguido por um do grupo experimental. Cada rato foi posicionado na plataforma central de frente para um dos braços fechados e observado durante 5 minutos, na ausência do operador na sala de teste. Ao fim do teste, a câmera era desligada e o animal devolvido a uma gaiola, separada dos demais animais que ainda não haviam passado pelo teste. Os comportamentos registrados foram: número de entradas nos braços abertos; número de entradas nos braços fechados; cruzamento no centro; avaliação e frequência em que o animal apresenta o comportamento de estirar a cabeça para fora dos limites da plataforma dos braços abertos (stretching) .

Figura 10 – Imagem representativa do teste comportamental de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)



Fonte: Ong, F.M.P. (2024).

3.6. Análise Estatística

No caso do experimento 1 com camundongos, os dados foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett e Brown-Forsythe). Foram aplicados o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo Teste Tukey. O teste t de Student também foi aplicado. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e o nível de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$). Para o experimento 2 com ratos, os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (teste de Levene e Brown-Forsythe), e, quando atendidos os requisitos de ambos os testes, foi aplicado o teste t de Student para comparação entre as médias dos grupos de fêmeas e de machos (separadamente). Quando não foi observada distribuição normal e homogeneidade das variâncias, adotou-se teste estatístico não paramétrico de Kruskal Wallis, seguido do de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e o nível de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 9.4.1.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio-piloto

4.1.1. Adaptação dos camundongos à formulação gelatinosa – essência bacon

Os testes de adaptação dos animais piloto à ingestão voluntária foram iniciados com a formulação gelatinosa a base de ágar-ágar e essência de bacon. Para este primeiro teste de verificação da aceitação do sabor da formulação gelatinosa, esta foi colocada diretamente na gaiola dos camundongos machos e fêmeas, sem a inserção da divisória. Esse procedimento foi repetido por 3 dias, no horário das 13hs e foi feita a verificação da ingestão por 1 hora. Nesse primeiro teste, tanto os machos como as fêmeas deram apenas mordiscadas no composto gelatinoso.

4.1.2. Adaptação dos camundongos à formulação gelatinosa – essência de caramelo

Para o teste seguinte, optou-se por um sabor doce, com a formulação gelatinosa à base de ágar-ágar levemente adoçada com stevia 100% natural (zero açúcar, zero lactose e zero calorias), e gotas de essência de caramelo. Esse teste foi realizado por 3 dias. Os animais ingeriram toda a formulação gelatinosa, durante o período de 1h de verificação.

4.1.3. Adaptação dos camundongos à gaiola com divisória

Após a aceitação da formulação gelatinosa doce, nos dias subsequentes os animais foram adaptados à gaiola com a divisória. Para esse teste, foi utilizada uma gaiola com papel absorvente, onde foi inserida a divisória de acrílico transparente em forma de cruz, e colocados cada animal em um quadrante. No primeiro dia, os animais ficaram na gaiola por 3 minutos e nos segundo e terceiro dias, por 5 minutos, sendo que no terceiro dia foi oferecida também a formulação gelatinosa de escolha. No primeiro dia, os animais nos diferentes quadrantes, urinaram e defecaram com maior frequência em relação ao segundo dia. No terceiro dia houve menor frequência na micção e defecação.

4.1.4. Adaptação diária dos camundongos à ingestão voluntária

Os camundongos machos e fêmeas foram colocados nas gaiolas com divisórias, juntamente com a formulação gelatinosa doce, adicionada do esqualeno, e deixados por no máximo 10 minutos. Foi verificada a velocidade de ingestão por cada animal. Na primeira semana, os animais ingeriram em 10 minutos, tendo esse tempo reduzido para 5 minutos na semana subsequente. Esses testes foram realizados no período da tarde, das 13 às 14hs, sem período de jejum. Durante essas duas semanas, não foram observados sinais de micção e defecação na gaiola durante a ingestão voluntária.

4.1.5. Padronização da Sala para os Testes Comportamentais

Os camundongos machos e fêmeas do ensaio piloto também foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto (CA) e labirinto em cruz elevado (LCE), para padronização da sala de comportamento, incluindo a melhor posição do equipamento, posição da câmera, tempo de exposição dos animais ao teste e logística no momento do teste. Para o tempo de exposição ao teste de CA foram definidos 10 minutos e para o tempo de exposição no LCE foram definidos 5 minutos.

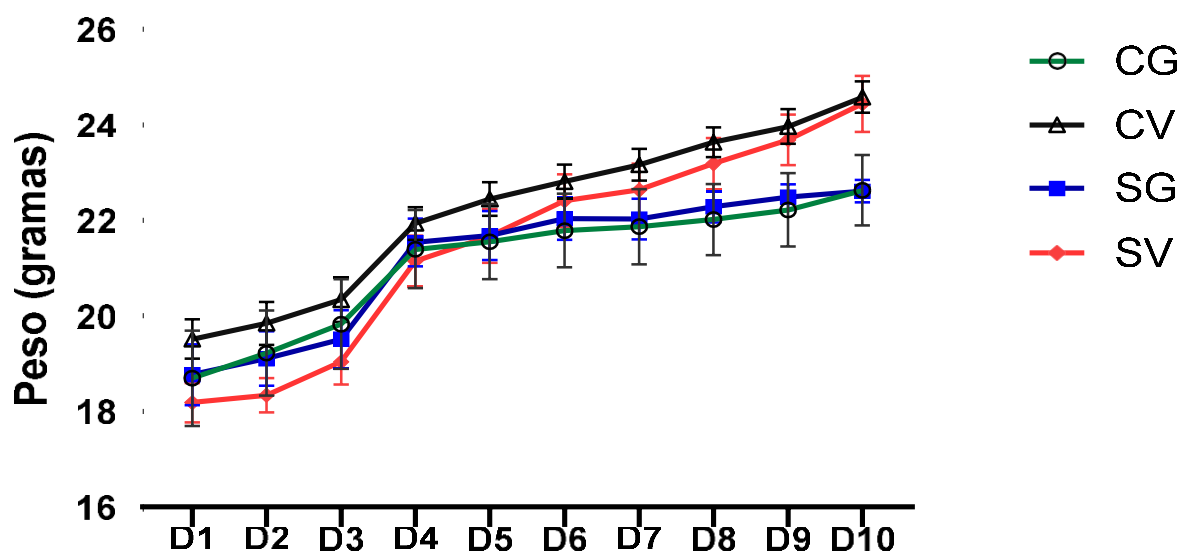
Foi definido também a limpeza do equipamento com álcool 5% ao invés de 70%, para que o excesso de odor não afetasse os animais. Foi determinado, ainda, que participariam do teste um animal do grupo ingestão voluntária, após um animal do grupo gavagem, sempre intercalando os grupos.

4.2. Experimento 1

4.2.1. Ganho de peso de camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV

Não houve diferenças ($p > 0.05$) entre os animais dos grupos CG, CV, SG e SV quanto ao ganho de peso durante período de 10 dias (Figura 11).

Figura 11 - Ganho de peso de camundongos C57BL/6J dos grupos CG, CV, SG e SV. Ausência de diferenças estatísticas ($P>0,05$) entre os grupos



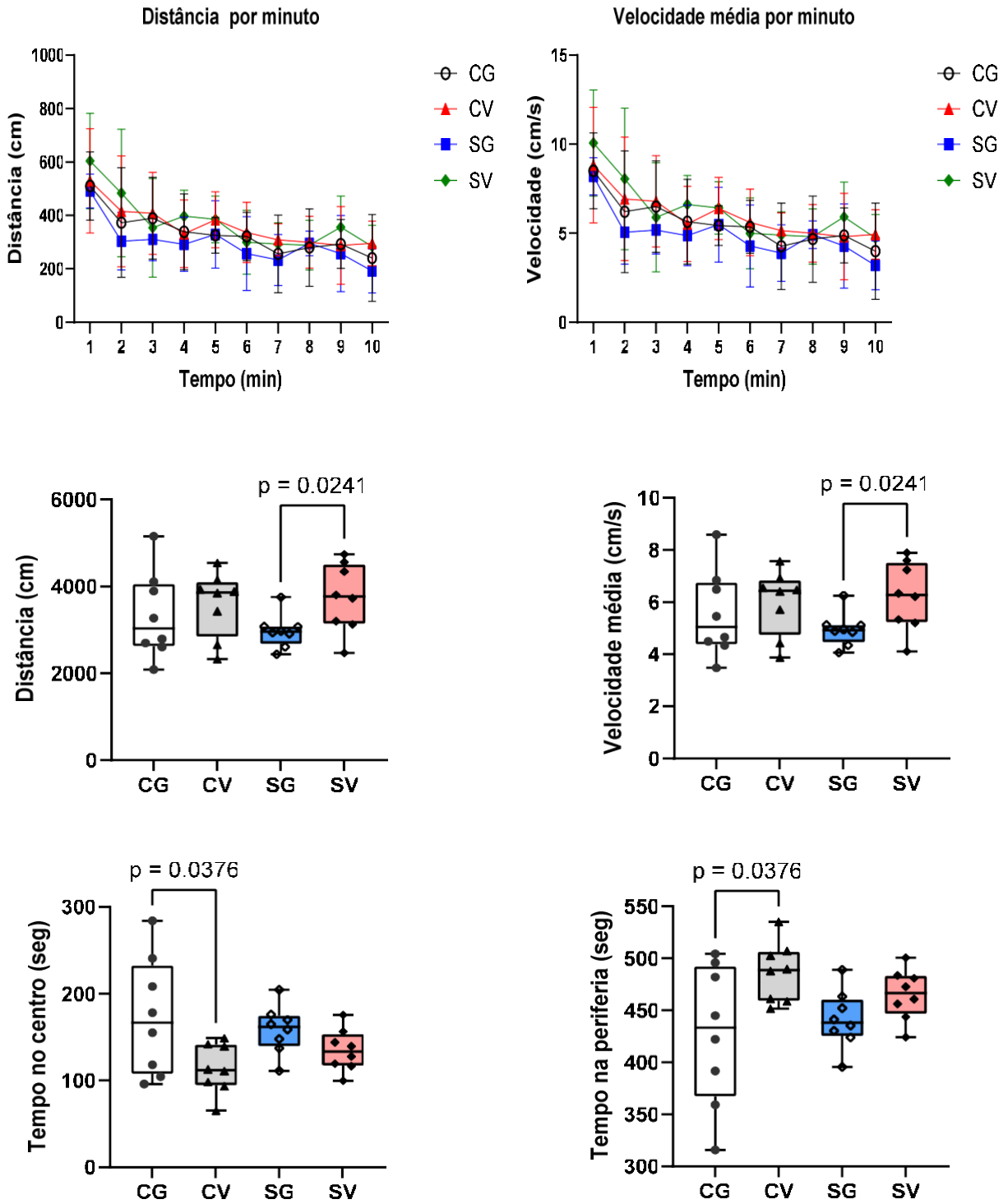
Fonte: Ong, F.M.P. (2024).

Resultados expressos em média e erro padrão. Sem diferenças estatísticas ($P>0,05$) de acordo com teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo Teste Tukey.

4.2.2. Teste de Comportamento do Campo Aberto (CA) de camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV

Comparado ao grupo SG, o grupo SV apresentou maior distância percorrida ($t=2,528$, $df=14$, $p= 0,0241$), com maior ($t=2,528$, $df=14$, $p= 0,0241$) velocidade (Figura 12). Não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos CG e CV quanto a esses parâmetros. Não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos CG e CV e SC e SV quanto à distância percorrida por minuto e velocidade média por minuto. Comparado ao grupo CG, o grupo CV permaneceu menor ($t=2,296$, $df=14$, $p= 0,0376$) tempo no centro e maior ($t=2,296$, $df=14$, $p= 0,0376$) tempo na periferia. Não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos SG e SV quanto a esse parâmetro. Não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos CG e CV e SC e SV quanto as frequências de levantar e de grooming (Figura 13).

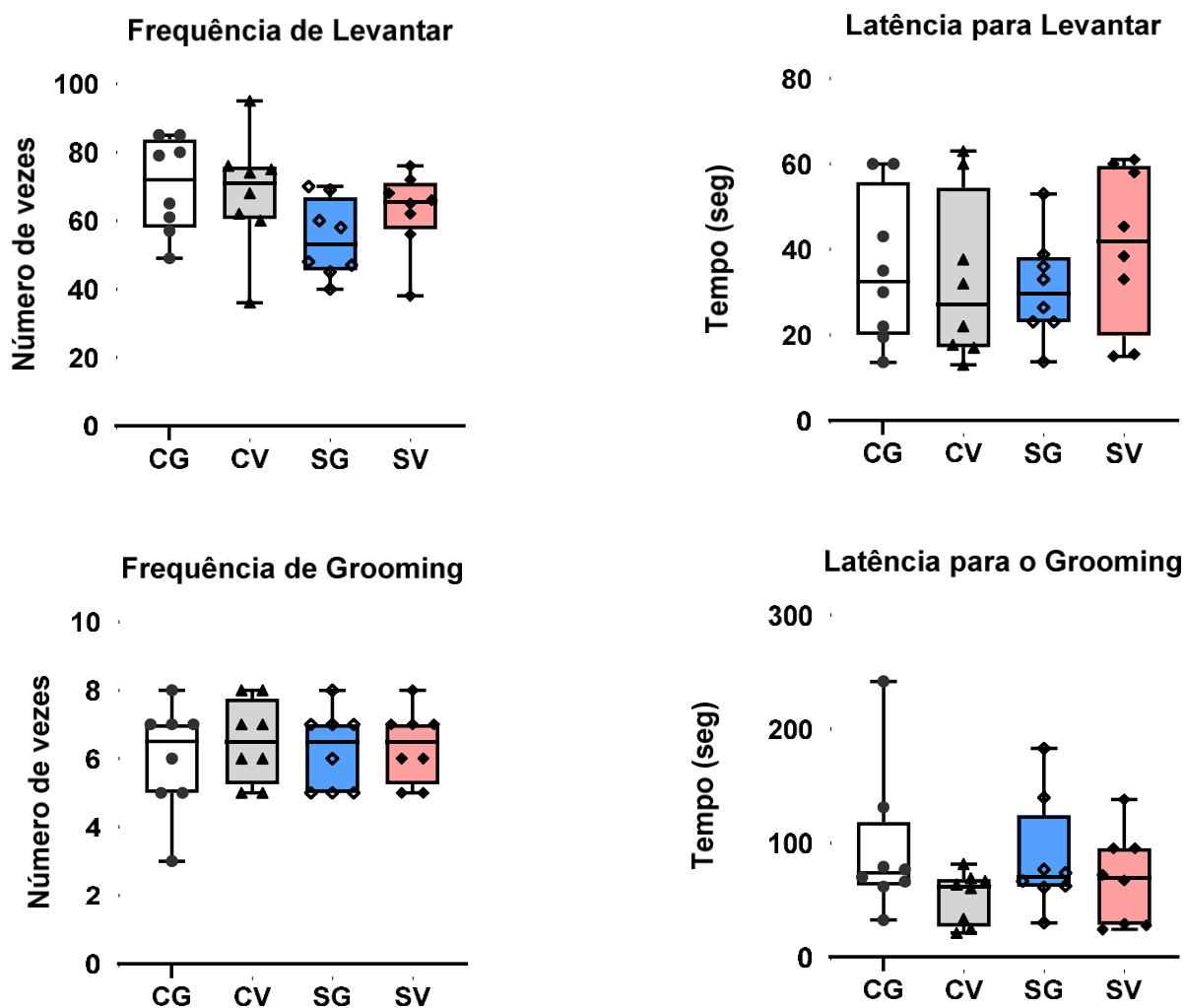
Figura 12 - Parâmetros de atividade geral no campo aberto dos camundongos C57BL/6J dos grupos CG, CV, SG e SV



Fonte: Ong, F.M.P. (2024).

Os resultados são expressos em média e erro padrão. Diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$), de acordo com Teste t de Student não pareado.

Figura 13 – Atividade exploratória (levantar) e grooming no campo aberto dos camundongos C57BL/6J dos grupos CG, CV, SG e SV



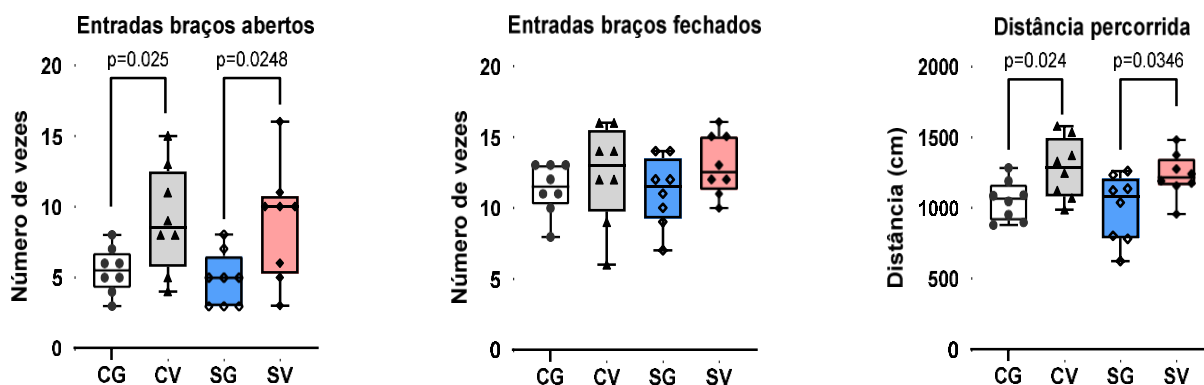
Fonte: Ong, F.M.P. (2024).

Os resultados são expressos em média e erro padrão. Sem diferenças ($P > 0,05$) de acordo com Teste t de Student não pareado.

4.2.3. Teste de Comportamento do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV

Comparado aos grupos CG e SG, os grupos CV e SV apresentaram, respectivamente, maior frequência de entradas de braços abertos ($t=2,509$, $df=14$, $p=0,025$, CV; $t=2,514$, $df=14$, $p=0,0248$, SV) e distância percorrida ($t=2,530$, $df=14$, $p=0,024$, CV; $t=2,340$, $df=14$, $p=0,0346$, SV) (Figura 14). Não houve diferenças ($p>0,05$) entre os grupos CG e CV e SG e SV quanto à frequência de entradas de braços fechados.

Figura 14 - Parâmetros de número de entradas nos braços abertos (NEBA), número de entradas nos braços fechados (NEBF), a distância percorrida e a velocidade média no LCE dos camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV



Fonte: Ong, F.M.P. (2024).

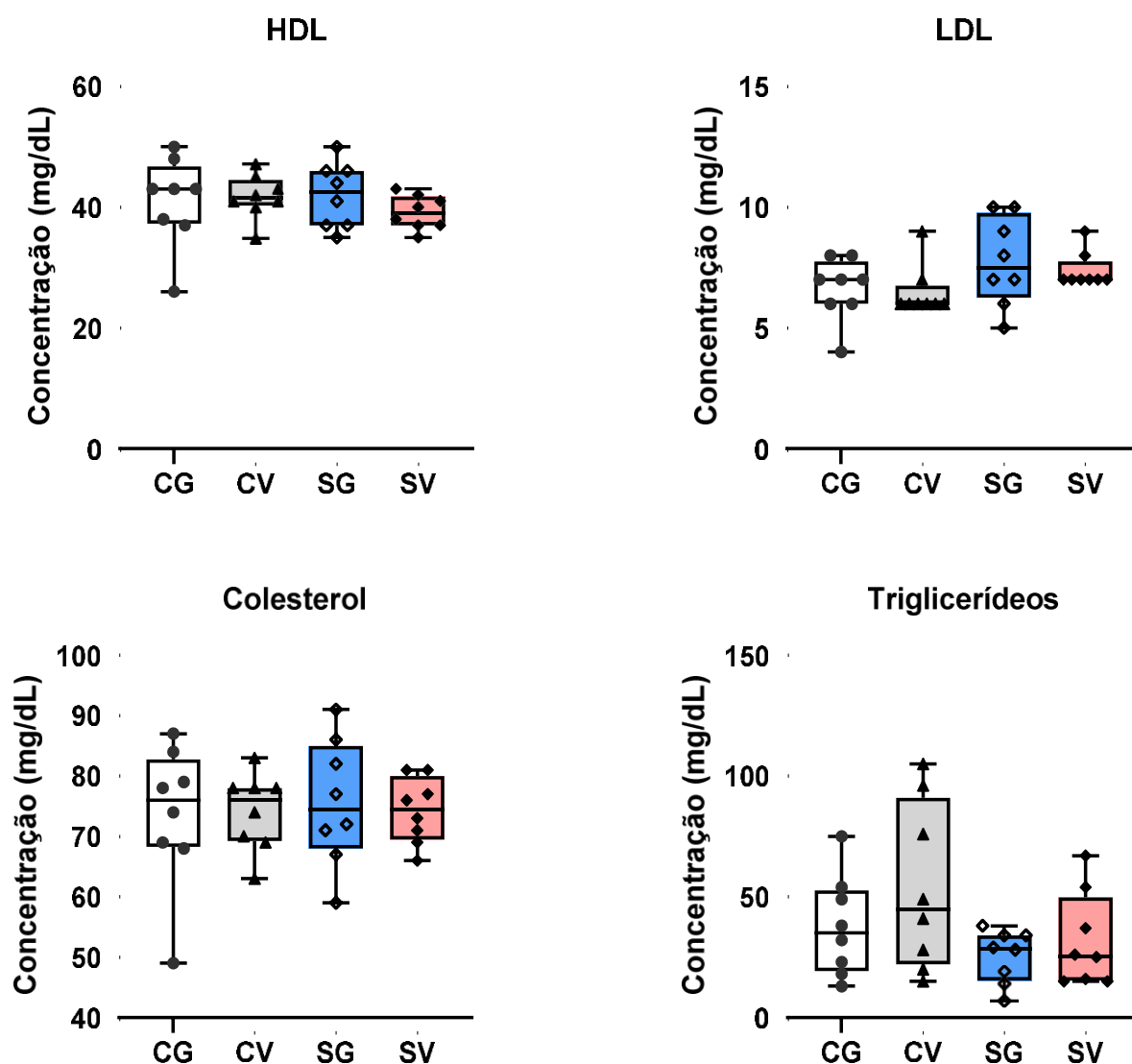
Os resultados são expressos em média e erro padrão. Diferenças estatísticas ($P\leq 0,05$), de acordo com Teste t de Student não pareado.

4.2.4. Parâmetros séricos de camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV

Não houve diferenças ($p>0,05$) entre os grupos CG, CV, SG e SV quanto às concentrações séricas de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL e triglicerídeos (Figura 15).

No entanto, observamos que os grupos da ingestão voluntária (CV e SV) apresentaram menor variabilidade em relação à média para as dosagens de HDL, LDL e colesterol em comparação aos grupos gavagem (CG e SG) (Tabela 1).

Figura 15 - Parâmetros lipídicos séricos de camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV. n=8



Fonte: Ong, F.M.P. (2024).

Os resultados são expressos em média e erro padrão. Sem diferenças estatísticas ($P > 0,05$) de acordo com o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo Teste Tukey.

Tabela 01 - Coeficiente de variação das amostras de parâmetros lipídicos séricos (HDL, LDL, colesterol e triglicerídeos) em camundongos C57BL/6 machos dos grupos CG, CV, SG e SV

Parâmetros lipídicos	Coeficiente de variação (%)			
	CG	CV	SG	SV
HDL	18,25	8,56	12,73	7,16
LDL	19,66	16,45	23,64	10,09
Colesterol total	16,21	8,69	13,89	7,37
Triglicerídeos	55,13	64,43	43,06	61,07

Fonte: Ong, F.M.P. (2024).

Observação: n=8 por grupo.

4.2.5. Concentrações hepáticas de esqualeno de camundongos dos grupos CG, CV, SG e SV

Não houve diferenças ($p > 0.05$) entre os grupos CG, CV, SG e SV quanto às concentrações hepáticas de esqualeno (Tabela 2, Figura 16). Em comparação ao grupo CV, o SV apresentou aumento de 2,7 x nas concentrações hepáticas de esqualeno.

Tabela 02 - Concentrações hepáticas de esqualeno de camundongos C57BL/6 machos dos grupos CG, CV, SG e SV

Concentrações hepáticas de esqualeno (ng/mg)			
CG	CV	SG	SV
13 ± 2	7 ± 6	10 ± 9	19 ± 15

Fonte: Ong, F.M.P. (2024).

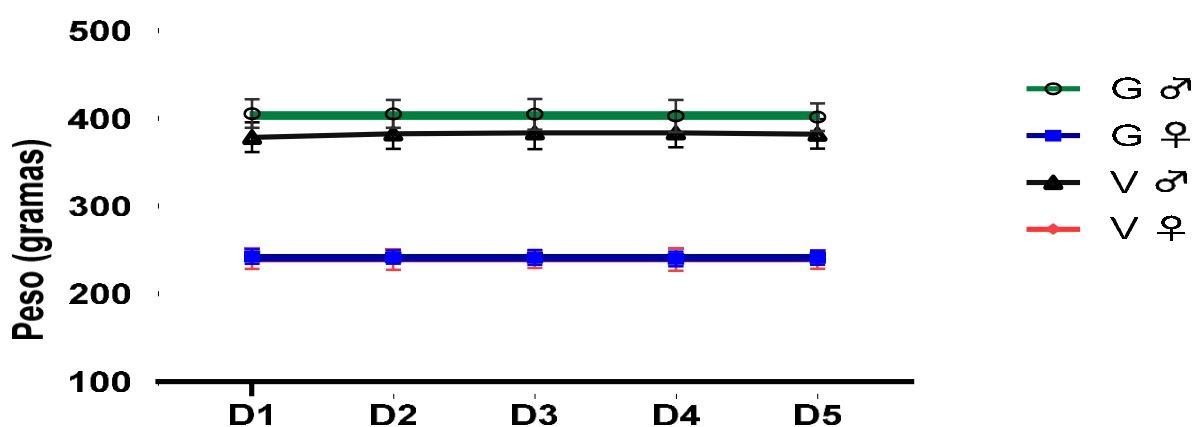
Observação: n = 4/grupo. Os resultados são expressos em média e erro padrão. Sem diferenças ($P > 0.05$) de acordo com Teste t de Student não pareado.

4.3. Experimento 2

4.3.1. Ganho de peso dos ratos dos grupos G e V, machos e fêmeas

Não houve diferenças ($p>0.05$) quanto ao ganho de peso durante período de 05 dias entre os machos dos grupos G e V e fêmeas dos grupos G e V (Figura 17).

Figura 16 - Ganho de peso de ratos Wistar Kyoto dos grupos G e V, machos e fêmeas.



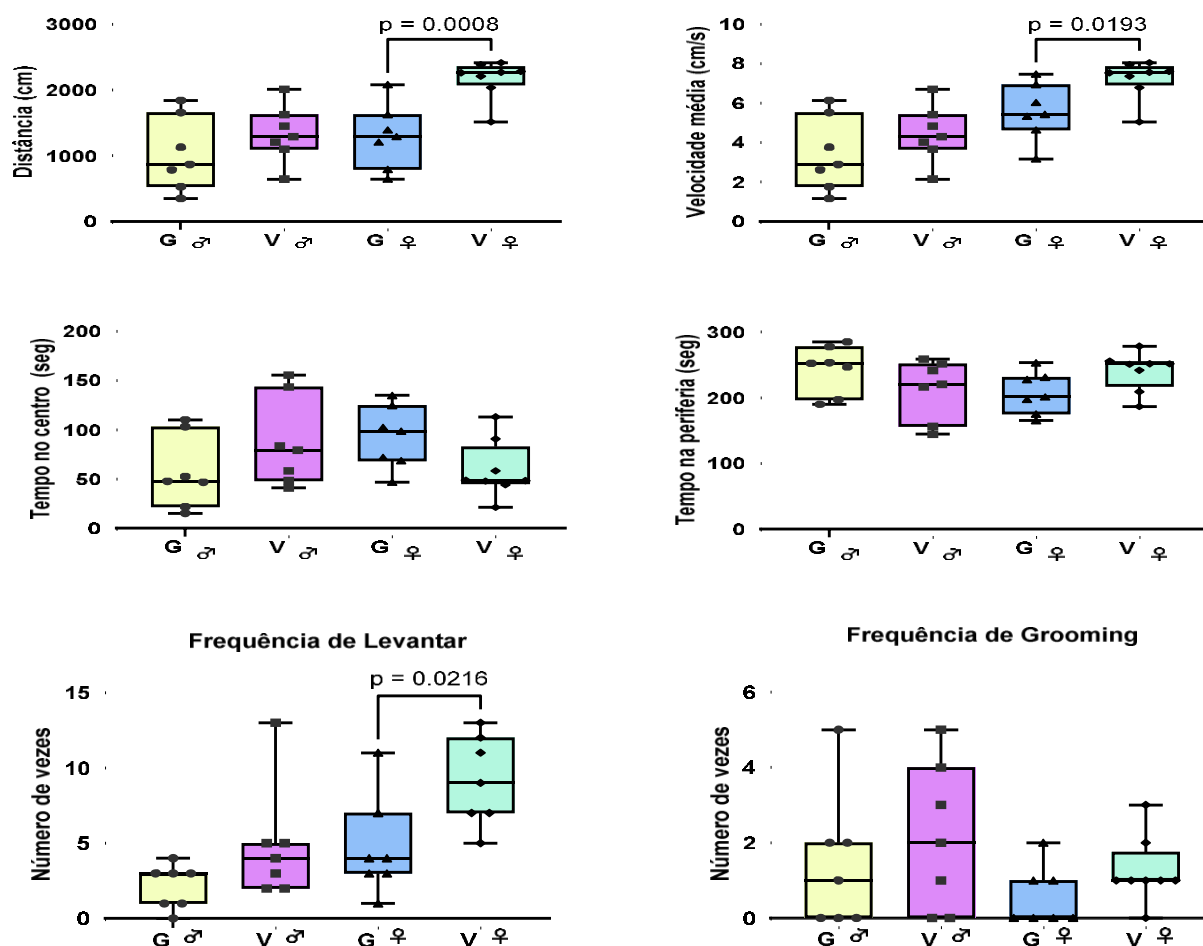
Fonte: Santos, G.D.E. (2024)

Resultados expressos em média e erro padrão. Sem diferenças estatísticas ($P>0,05$) de acordo com o Teste t de Student não pareado. .

4.3.2. Teste de Campo Aberto (CA) de ratos machos e fêmeas dos grupos gavagem e gelatina

Comparado aos ratos fêmeas do grupo gavagem, ratos fêmeas do grupo gelatina apresentaram maior distância percorrida ($t=4,334$, $df=13$, $p= 0,001$), maior velocidade média ($t=2,668$, $df=13$, $p= 0,019$) e frequência de levantar ($t=2,639$, $df=12$, $p= 0,0216$) (Figura 18). Não houve diferenças ($p>0,05$) entre ratos machos dos grupos gavagem e gelatina quanto a esses parâmetros. Além disso, não houve diferenças ($p>0,05$) entre ratos machos dos grupos gavagem e gelatina e entre ratos fêmeas dos grupos gavagem e gelatina quanto ao tempo de permanência no centro e periferia, bem como frequência de grooming.

Figura 17 - Parâmetros de atividade geral no campo aberto (CA) de ratos Wistar Kyoto, machos e fêmeas, dos grupos gavagem e gelatina

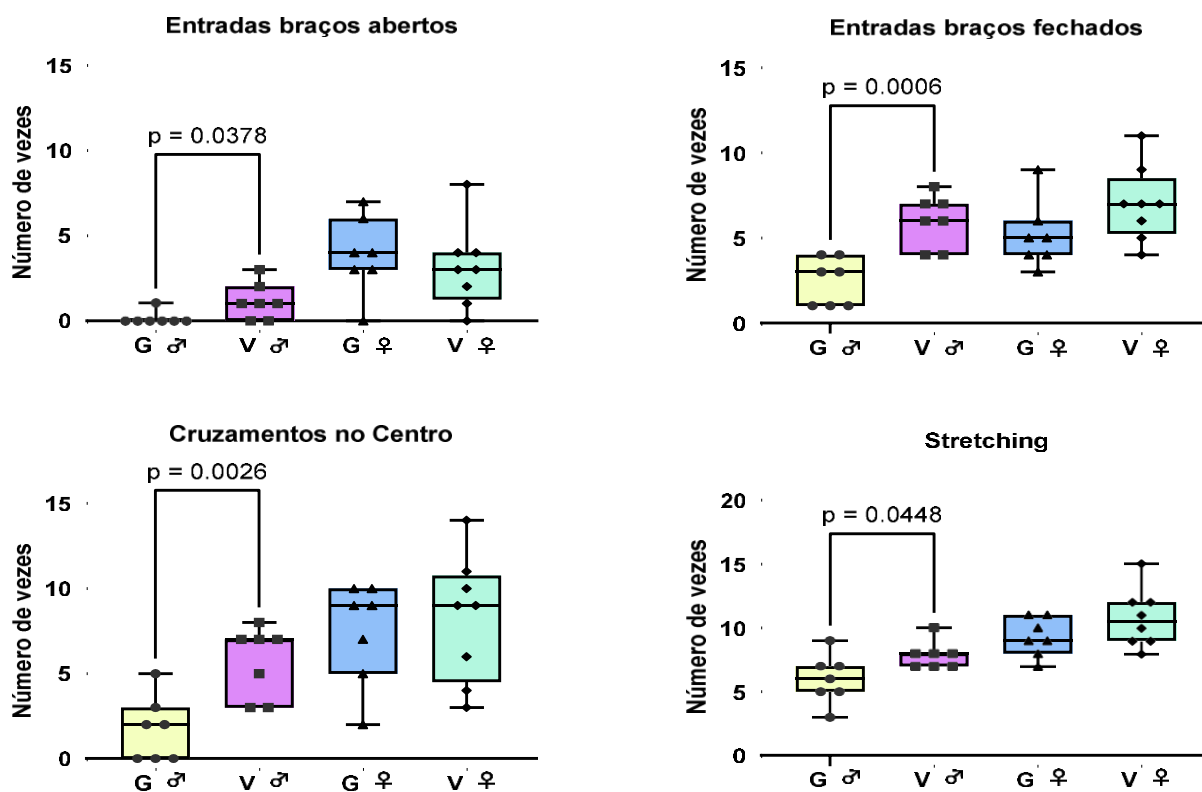


Os resultados são expressos em média e erro padrão. Diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$), de acordo com Teste t de Student não pareado.

4.3.3. Teste de Comportamento – Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de ratos machos e fêmeas dos grupos gavagem e gelatina

Comparado aos ratos machos do grupo gavagem, ratos machos do grupo gelatina apresentaram maior frequência de entradas braços fechados ($t=4,564$, $df=12$, $p= 0,0006$) e abertos ($t=2,333$, $df=12$, $p= 0,0378$), de cruzamentos no centro ($t=3,787$, $df=12$, $p= 0,0026$) e de stretching ($t=2,240$, $df=12$, $p= 0,0448$) (Figura 19). Não houve diferenças ($p > 0,05$) entre ratos fêmeas dos grupos gavagem e gelatina quanto a esses parâmetros.

Figura 18 - Parâmetros de número de entradas nos braços abertos (NEBA), número de entradas nos braços fechados (NEBF), cruzamento no centro e stretching no LCE dos ratos Wistar Kyoto, machos e fêmeas dos grupos gavagem e gelatina



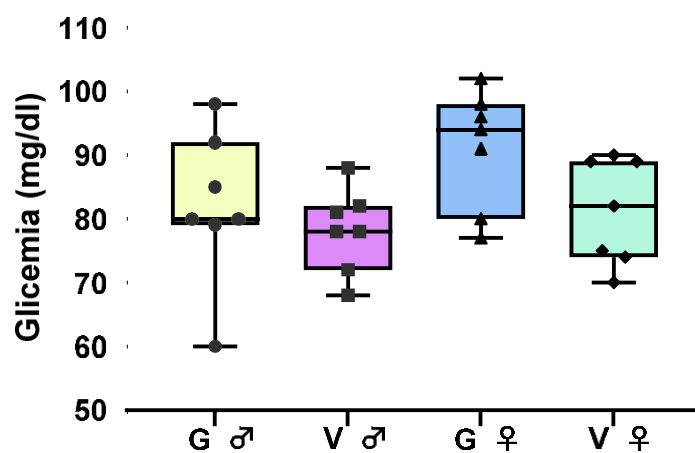
Fonte: Santos, G.D.E. (2024)

Os resultados são expressos em média e erro padrão. Diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$), de acordo com Teste t de Student não pareado.

4.3.4. Glicemia de ratos machos e fêmeas dos grupos gavagem e gelatina

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre ratos machos e fêmeas dos grupos gavagem e gelatina quanto a esse parâmetro (Figura 20).

Figura 19 - Glicemia de ratos Wistar Kyoto, machos e fêmeas, dos grupos gavagem e gelatina



Fonte: Santos, G.D.E. (2024)

Os resultados são expressos em média e erro padrão. Sem diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$), de acordo com Teste t de Student.

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo experimental foi desenvolver um método inovador para administrar substâncias, como fármacos, agentes tóxicos e componentes alimentares, através da ingestão voluntária. Esse método envolveu uma formulação gelatinosa palatável e sem calorias, visando alcançar a mesma eficácia do método convencional de administração oral por gavagem, porém, de maneira menos estressante.

Para tanto, foram conduzidos 3 experimentos em roedores. O experimento piloto foi destinado a ajustar a composição da formulação gelatinosa. No experimento 1, foi testado o oferecimento a camundongos de formulação gelatinosa doce com sabor caramelo, contendo esqualeno. Foram avaliados parâmetros comportamentais, metabólicos e de armazenamento do esqualeno. Finalmente, no experimento 2, foi testado em ratos machos e fêmeas, o oferecimento de formulação gelatinosa sabor bacon. Também foram avaliados parâmetros comportamentais e metabólicos.

Camundongos apresentam seletividade por sabores. Assim, por exemplo, o sabor cítrico tem pouco apelo para camundongos (MARTINS et al., 2022). Por outro lado, o sabor adocicado é preferido por esses animais, especialmente da linhagem C57BL/6 (SCLAFANI; ACKROFF, 2017). No caso de ratos, verificou-se preferência por leite condensado em comparação à geleia de morango (FERREIRA-DUARTE et al., 2023)

A preferência de camundongos por determinados sabores varia entre linhagens de camundongos e pode ser influenciada por fatores genéticos (TEIXEIRA-SANTOS; ALBINO-TEIXEIRA; PINHO, 2021). Assim, por exemplo, camundongos C57BL/6 apresentam maior preferência por sacarose e sacarina, em comparação a camundongos 129 (129P3/J, 129X1/SvJ) (SCLAFANI, 2007). De acordo com o autor, essas diferenças estariam relacionadas a variações nos receptores gustativos entre as linhagens. A partir do experimento piloto, foi verificado que camundongos preferiram a formulação gelatinosa de sabor adocicado e aroma de caramelo, em comparação à formulação de sabor bacon. Em estudo em camundongos C57BL/6 fêmeas, verificou-se que os animais aceitaram de forma semelhante massa de cookies açucarada, aromatizados com pó de manteiga de amendoim, pó de gelatina sabor berry ou pequenos pedaços de bacon frito (DUDLEY; BOIVIN, 2018).

Esses resultados sugerem que o sabor adocicado represente componente mais importante na palatabilidade de alimentos para camundongos.

Além disso, verificou-se que camundongos C57BL/6 machos preferiram o consumo de pellets de gelatina comercial sabor morango em comparação ao sabor limão (MARTINS et al., 2022). Os dados desse estudo também mostraram que as linhagens de camundongos variam em relação à aceitação da ingestão de formulações à base de gelatina, tendo a linhagem C57BL/6 as ingerido de forma mais rápida em comparação à linhagem FVB/N (MARTINS et al., 2022).

No caso específico de ratos, observou-se que aqueles da linhagem Sprague-Dawley e lactantes preferiram formulação gelatinosa sem sabor e não adoçadas em comparação àquelas saborizadas com aroma de baunilha e/ou adoçadas com sucralose (RUVIRA et al., 2023). Além disso, ratas Wistar prenhas aceitaram o consumo de formulação gelatinosa sabor carne por 14 dias consecutivos (DE ALMEIDA et al., 2021). Em nosso estudo, verificamos que ratos Wistar machos e fêmeas aceitaram bem a formulação gelatinosa saborizada com essência de bacon, em contraste com camundongos machos e fêmeas que a rejeitaram. Estudo prévio mostra que ratos submetidos a restrição alimentar apresentaram preferência por sabor gorduroso em comparação ao açucarado, enquanto os não restritos não apresentaram diferenças (LUCAS; SCLAFANI, 1996).

Camundongos apresentam comportamento neofóbico e normalmente evitam novos alimentos. Além disso, experiências aversivas iniciais com algum alimento tendem a resultar em resistência ao seu consumo no longo prazo (FILE, 2001). Desse modo, além da questão do ajuste adequado do sabor da formulação gelatinosa, também o treinamento dos animais para seu consumo deve ser feito de forma progressiva. Outro fator que reduz a neofobia a alimentos em roedores é a introdução de ambiente enriquecido (MODLINSKA; CHRZANOWSKA; PISULA, 2020). Em nosso estudo, utilizamos ambiente enriquecido, e verificamos que, inicialmente, os camundongos levavam cerca de 7 minutos para consumir completamente a formulação gelatinosa, tempo que se reduziu para 5 minutos após poucos dias de treinamento.

Um ponto a ressaltar na formulação gelatinosa desenvolvida no presente estudo para camundongos, é a de que o seu sabor adoçado foi obtido pela inclusão da estévia. Este adoçante é proveniente de uma planta nativa do Paraguai e Argentina, consumida há séculos pelos indígenas, com 0 calorias, não consegue ser digerido, somente no cólon, pode ser usado até mesmo para tratamento de indivíduos diabéticos. A stevia adoça 300x mais que o açúcar (SAMUEL et al. 2018).

Segundo Smith e SCAFLANI (2002), o adoçante não calórico sacarina é altamente palatável para roedores e foi usado para replicar muitas das propriedades hedônicas recompensadoras da sacarose. Estudo prévio mostrou que camundongos C57BL/6 apresentaram preferência por adoçantes provenientes da estévia comparável à sacarina, o que é um resultado importante dado que esses animais apresentam pouca preferência a outros adoçantes como ciclamato e aspartame (SCLAFANI, 2006). Dessa forma, a estévia pode ser considerada como adoçante adequada para estratégias de ingestão voluntária. Dado que sabores adocicados provenientes de açúcares como sacarose e fructose, ou adoçantes como sacarina e sucralose, podem condicionar de formas distintas a preferência de camundongos por sabores, a combinação de tais ingredientes com os aromas deve ser cuidadosamente considerada (SCLAFANI; ACKROFF, 2018).

Teixeira-Santos et al. (2021) mencionam que embora o consumo diário de 60 µL de geléia de morango, o que equivale a cerca de 1 a 1,7% da ingestão calórica diária de camundongos, não induziu alterações dietéticas significativas, seu uso em experimentos mais longos deve ser considerado com cautela. Nesse sentido, a formulação gelatinosa adocicada com estévia e sabor caramelo, desenvolvida no presente estudo, apresenta a vantagem de não conter calorias e apresentar poucos componentes. Foi verificado no presente estudo que o consumo por 3 semanas da formulação gelatinosa adocicada não alterou os parâmetros lipídicos em camundongos. Dado que a estévia apresentou bioatividade em outros estudos em roedores, como por exemplo, a modulação da microbiota intestinal em camundongos obesos (BECKER et al., 2020), ou ações anti-inflamatórias e antioxidantes em ratos (RAMOS-TOVAR et al., 2018), em doses (1-100 mg/kg de peso corpóreo) menores ou na mesma faixa do presente estudo (85 mg/kg de peso corpóreo), torna-se importante avaliar potenciais efeitos do consumo prolongado do adoçante nas nossas concentrações.

A análise de parâmetros exploratórios e motores em um ambiente novo, assim como avaliação da ansiedade frente a um espaço aberto, foram realizados através dos testes comportamentais de Labirinto em cruz elevado e campo aberto.

Dentre os métodos disponíveis para avaliar o comportamento de roedores, destaca-se o labirinto em cruz elevada, que é particularmente útil para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade (RODGERS; DALVI, 1997; (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008). Ele é um dos métodos mais simples de análise comportamental (HIMANSHU et al., 2020). A aversão de camundongos a explorar o braço aberto do labirinto é associada ao medo que esses animais apresentam em relação a espaços abertos e elevados (KOMADA et al. 2008). No presente estudo, foi verificado que os camundongos que receberam a formulação gelatinosa com ou sem esqualeno apresentaram maior número de entradas nos braços abertos, e maior distância percorrida em comparação aos seus respectivos controles que receberam gavagem com ou sem esqualeno. No caso do teste do labirinto em cruz em ratos, verificamos que machos, mas não fêmeas, que ingeriram a formulação gelatinosa sabor bacon, apresentaram menor nível de ansiedade em comparação aos animais que receberam gavagem. Esses resultados indicam que a ingestão voluntária induz menor nível de ansiedade em relação ao método de gavagem tanto em camundongos como ratos machos.

Outro método bastante utilizado para avaliar o comportamento de roedores é o teste do campo aberto (ANTIORIO et al., 2022). Este teste é empregado para avaliar, de forma qualitativa e quantitativa, a disposição de explorar a atividade locomotora de camundongos e ratos (HIMANSHU; DHARMILA; SAKAR, 2020). O parâmetro inicial e potencialmente o mais crucial a ser avaliado no teste de campo aberto é a distância total percorrida pelo animal (SEIBENHENER; WOOTEN MC, 2015). Foi verificado que camundongos que receberam a formulação gelatinosa com esqualeno percorreram maior distância e com maior velocidade no campo. No caso do teste do campo aberto em ratos, verificamos que fêmeas, mas não machos, que ingeriram a formulação gelatinosa sabor bacon, também percorreram maior distância e com maior velocidade no campo, indicando maior atividade exploratória em comparação aos animais que receberam gavagem. Coletivamente, esses dados junto com os do teste de labirinto em cruz elevado indicam que a ingestão voluntária em camundongos e ratos induz menor estresse e ansiedade em comparação ao método de gavagem.

Uma fase do ciclo de vida em que roedores são especialmente suscetíveis ao estresse induzido por gavagem oral é a gestação (BALCOMBE; BARNARD; SANDSKY, 2004).

Verificou-se que o procedimento repetido de gavagem em camundongas da linhagem 129S1/SvImJ e C57BL/6 resultou em redução pronunciada das taxas de prenhez (WARREN et al., 2022). De forma interessante, o oferecimento de manteiga de amendoim no lugar da gavagem resultou na linhagem 129S1/SvImJ em maior taxa de prenhez, que foi, entretanto, menor em comparação aos animais controles. Por outro lado, esse alimento não alterou esse parâmetro em animais C57BL/6, quando comparado aos controles. Além disso, a gavagem aumentou os níveis séricos de corticosterona, enquanto o consumo de manteiga de amendoim não alterou esse marcador de estresse no dia gestacional D10 em camundongas 129S1/SvImJ em comparação aos controles; em camundongas C57BL/6 não houve nenhum desses efeitos (WARREN et al., 2021). Esses dados mostram que a suscetibilidade ao estresse induzido por gavagem varia de acordo com a linhagem, e que o uso de manteiga de amendoim como veículo de ingestão voluntária representa alternativa menos estressante. De forma similar, o oferecimento de massa de cookie com sabor bacon foi menos estressante do que a gavagem oral em camundongos C57BL/6, com base em parâmetros como batimento cardíaco, pressão arterial e metabólitos fecais da corticosterona (WALKER et al, 2012).

Outro aspecto relevante consiste na possibilidade de alimentos altamente palatáveis como cookies e geléias possam eventualmente interferir na biodisponibilidade da substância administrada (KÜSTER et al., 2012; DIOGO et al., 2015). Dhawan e colaboradores (2018) investigaram o perfil farmacocinético da droga modafinil, em teste agudo, por meio da administração de comprimidos de gelatinas palatáveis contendo o fármaco. A concentração de modafinil no tecido cerebral demonstrou um padrão comparável aos dados publicados anteriormente de administração oral de modafinil na dose de 2 mg/kg via gavagem. Os autores demonstraram que esta é uma via eficaz de administração por via oral de compostos biodisponíveis termicamente estáveis, eliminando o estresse/desconforto e risco para a saúde associado à gavagem oral.

Verificou-se em ratos que a absorção intestinal do esqualeno é elevada, sendo que o seu principal destino metabólico é a conversão a ácidos biliares no fígado (TILVIS e MIETTINEN, 1983a). O consumo por ratos de ração contendo 1% de esqualeno resultou em sua absorção e excreção diária de 28 e 38 mg, respectivamente (CHANNON; TRISTRAN, 1937).

Estudos iniciais mostraram que a administração de esqualeno a esses animais também resultou em seu armazenamento no tecido intestinal, adiposo e hepático (TILVIS & MIETTINEN, 1983b). Mais recentemente, a administração de esqualeno a diferentes espécies como camundongos, coelhos e porcos resultou em armazenamento hepático (GABÁS-RIVERA et al., 2020; MARTÍNEZ-BEAMONTE et al., 2021; HERRERA-MARCOS et al., 2023).

De forma interessante, observou-se que camundongos C57BL/6J deficientes para Apoe mostraram uma maior sensibilidade aos aumentos nas concentrações de esqualeno hepático em comparação a coelhos New Zealand (MARTÍNEZ et al., 2018). No presente estudo, a administração de 26 mg de esqualeno/dia via formulação gelatinosa, durante 3 semanas consecutivas, resultou em aumento de 2,7 vezes nas concentrações hepáticas do derivado isoprênico. Diferentemente de outros parâmetros, como concentrações plasmáticas de colesterol e triglicerídeos, não existe um valor de referência para esqualeno em roedores e humanos. De toda a forma, as concentrações hepáticas de esqualeno dos animais do presente estudo está próxima de valores obtidos para camundongos (5 ng/mg; GUILLÉN et al., 2008), ou mesmo, seres humanos (75 ng/mg) (POPA et al., 2015).

De forma interessante, o consumo de esqualeno via ração do tipo padrão ocidentalizada hiperlipídica na concentração de 1% (cerca de 15 mg/dia) por camundongos C57BL/6J deficientes para Apoe, durante 11 semanas consecutivas, resultou em aumento de cerca de 7 vezes nas concentrações hepáticas (GABÁS et al., 2020). Por outro lado, a administração por 10 semanas consecutivas de esqualeno via água de beber, na dose de 1 g/kg/dia, a camundongos dessa mesma linhagem, que consumiram dieta normo-lipídica, não resultou em aumento nas concentrações hepáticas (GUILLÉN et al., 2008). Desse modo, ácidos graxos na dieta parecem aumentar a biodisponibilidade do esqualeno (MARTÍNEZ et al., 2018). Visto que em nosso estudo os animais também receberam ração normolipídica, o fato de aumentos nas concentrações hepáticas de esqualeno terem ocorrido reforça que a nossa formulação gelatinosa representa uma opção efetiva para oferecimento de esqualeno a camundongos.

Diferentemente de estudos prévios, em que o consumo de esqualeno por camundongos e ratos, em doses próximas por nós utilizadas, aumentou ou diminuiu as concentrações plasmáticas de colesterol total, -HDL e/ou -LDL (SCOLASTICI; ONG; MORENO, 2004; GABÁS et al., 2014), em nosso estudo o isoprenóide não exerceu nenhum desses efeitos. Uma razão para tanto possa estar associada ao curto tempo de tratamento (3 semanas) com esqualeno. Nesse sentido, destacou-se que tanto a dose como a duração do tratamento com o derivado isoprênico influenciam os efeitos nas concentrações de colesterol plasmático (GABÁS et al., 2014).

Uma das limitações de outros métodos de ingestão voluntária, como o oferecimento de substâncias via água de beber, refere-se ao fato de que não é possível determinar a dose exata, nem o momento do consumo (RAYA; GIRARDI; HIPÓLIDE, 2019). No presente estudo, a solução para evitar essas questões foi introduzir divisória de acrílico na caixa, de modo a permitir que cada animal pudesse ingerir sozinho o pellet de gelatina, garantindo, ao mesmo tempo, permanência em seu ambiente original.

Com base nos resultados promissores obtidos no presente estudo, seria importante conduzir estudos adicionais para verificar o padrão de consumo das formulações gelatinosas por camundongos e ratos durante período prolongado e contendo outras substâncias, líquidas e sólidas. Além disso, seria ainda interessante verificar o efeito do consumo de formulação gelatinosa contendo esqualeno em roedores submetidos a modelos com alterações metabólicas, como obesidade, diabetes do tipo 2 e doença cardiovascular.

Por fim, consideramos que o presente estudo tenha contribuído por meio do desenvolvimento de uma abordagem de refinamento da forma de administração de substâncias a camundongos e ratos, representados pela ingestão voluntária de formulação gelatinosa saborizada. A divulgação dessa abordagem inovadora para a comunidade científica é fundamental, de modo que a sua adoção no contexto da pesquisa experimental tem o potencial de atender ao imperativo ético de melhorar o bem-estar dos animais.

6. CONCLUSÃO

As formulações gelatinosas com sabores caramelo ou bacon demonstraram ser métodos eficazes de ingestão voluntária, oferecendo uma alternativa viável à gavagem orogástrica em roedores. Especificamente, essas formulações reduziram o estresse em ratos e camundongos. Além disso, a formulação gelatinosa sabor caramelo mostrou-se adequada para a administração de esqualeno a camundongos. Dessa forma, a ingestão voluntária por meio do consumo de formulação gelatinosa saborizada representa um refinamento na técnica de gavagem oral, destacando-se como uma contribuição valiosa para a pesquisa experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, A.D.; LEUNG, E.J.Y.; WONG, B.A.; RIVERA, Z.M.G.; KRUSE, L.C.; CLARK, J.J.; LAND, B.B. **Orally consumed cannabinoids provide long-lasting relief of allodynia in a mouse model of chronic neuropathic pain.** *Neuropsychopharmacology*, 2020 Jun;45(7):1105-1114.

ABELSON, K.S.; JACOBSEN, K.R.; SUNDBOM, R.; KALLIOKOSKI, O.; HAU, J. **Voluntary ingestion of nut paste for administration of buprenorphine in rats and mice.** *Lab Anim.* 2012 Oct;46(4):349-51. doi: 10.1258/la.2012.012028. Epub 2012 Sep 11. PMID: 22969145.

ALMEIDA, E.R.M. de; MARTINELLI, E.C.L.; PEREIRA, E.C.; RASPANTINI, L.E.R.; HUEZA, I.M. **Alternative method for oral administration of insoluble toxins to rats.** A prenatal study of L-mimosine. *Toxicon.* 2021 Oct 30;202:82-89.

ANDERSEN, M.L.; WINTER, L.M.F. **Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns.** *An Acad Bras Cienc.* 2019;91(suppl 1):e20170238.

ANTIORIO, A.T.; ALEMÁN-LAPORTE, J.; ZANATTO, D.A.; PEREIRA, M.A.A.; GOMES, M.S.; WADT, D.; YAMAMOTO, P.K.; BERNARDI, M.M.; MORI, C.M. **Mouse Behavior in the Open-field Test after Meloxicam Administration.** *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2022 May 1;61(3):270-274. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-21-000046. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35101160; PMCID: PMC9137284.

ARANTES-RODRIGUES, R.; HENRIQUES, A.; PINTO-LEITE, R.; FAUSTINO-ROCHA, A.; PINHO-OLIVEIRA, J.; TEIXEIRA-GUEDES, C.; SEIXAS, F.; GAMA, A.; COLAÇO, B.; COLAÇO, A.; OLIVEIRA, P.A. **The effects of repeated oral gavage on the health of male CD-1 mice.** *Nova Yorque, Lab Anim.* 2012 May;41(5):129-34. doi: 10.1038/labani0512-129. PMID: 22517091.

ATCHA, Z.; ROURKE, C.; NEO, A.H.; et al. **Alternative method of oral dosing for rats.** *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010;49(3):335-343.

BALCOMBE, J.P.; BARNARD, N.D.; SANDUSKY, C. **Laboratory routines cause animal stress.** *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2004 Nov;43(6):42-51.

BALLS, M. 19. **Russell and Burch after 1959.** *Altern Lab Anim.* 2015 Nov;43(5):P59-60. doi: 10.1177/026119291504300518. PMID: 26551293.

BAUMANS, V. **Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals.** *Rev Sci Tech.* 2005 Aug;24(2):503-13. PMID: 16358504.

BECKER, S.L.; CHIANG, E.; PLANTINGA, A.; CAREY, H.V.; SUEN, G.; SWOAP, S.J. **Effect of stevia on the gut microbiota and glucose tolerance in a murine model of diet-induced obesity.** *FEMS Microbiol Ecol.* 2020 Jun 1;96(6):fiaa079.

BERG N, DE WEVER B, FUCHS HW, GACA M, KRUL C, ROGGEN EL. **Toxicology in the 21st century--working our way towards a visionary reality.** *Toxicol In Vitro.* 2011 Jun;25(4):874-81.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (CCAC) **Guidelines Mice.** 2019. Disponível em: <http://www.ccac.ca>. Acesso em: 12.10.2022.

CARDOZO, M.T.; CONTI, A. de; ONG, T.P.; SCOLASTICI, C.; PURGATTO, E.; HORST, M.A.; BASSOLI, B.K.; MORENO, F.S. **Chemopreventive effects of β -ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA.** *J Nutr Biochem.* 2011 Feb;22(2):130-5.

CHANNON, H.J.; TRISTRAM, G.R. **The effect of the administration of squalene and other hydrocarbons on cholesterol metabolism in the rat.** *Biochem J.* 1937 May;31(5):738-47.

CHESLER KC, MOTZ CT, BALES KL, ALLEN RA, VO HK, PARDUE MT. **Voluntary oral dosing for precise experimental compound delivery in adult rats.** *Lab Anim.* 2022 Apr;56(2):147-156.

DHAWAN, S.S.; XIA, S.; TAIT, D.S.; BUNDGAARD, C.; BOWMAN, E.; BROWN, V.J. **Oral dosing of rodents using a palatable tablet.** *Psychopharmacology (Berl).* 2018 May;235(5):1527-1532. doi: 10.1007/s00213-018-4863-2. Epub 2018 Mar 6. PMID: 29511808; PMCID: PMC5919998.

DIAZ, S.L. **Conducting and reporting animal experimentation: Quo vadis?** *Eur J Neurosci.* 2020 Sep;52(6):3493-3498.

DIOGO, L.N.; FAUSTINO, I.V.; AFONSO, R.A.; PEREIRA, S.A.; MONTEIRO, E.C.; SANTOS A.I. **Voluntary Oral Administration of Losartan in Rats.** *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015 Sep;54(5):549-56. PMID: 26424254; PMCID: PMC4587624.

DUARTE, A.C.; COSTA, E.C.; FILIPE, H.A.L.; SARAIVA, S.M.; JACINTO, T.; MIGUEL, S.P.; RIBEIRO, M.P.; COUTINHO, P. **Animal-derived products in science and current alternatives.** *Biomater Adv.* 2023 Aug;151:213428.

DUDLEY, E.S.; BOIVIN, G.P. **Evaluation of a Commercially Available Euthanasia Solution as a Voluntarily Ingested Euthanasia Agent in Laboratory Mice.** *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2018 Jan 1;57(1):30-34. PMID: 29402349; PMCID: PMC5875095.

FERREIRA-DUARTE, M.; LOPES, I.M.; MORATO, M.; DUARTE-ARAÚJO, M. **Rats prefer condensed milk to strawberry jam - a new possibility for voluntary oral drug administration.** *Lab Anim.* 2023 Sep 15:236772231194389. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10251944/>. Acesso em: 15.11.2023.

FILE, S.E. **Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse.** *Behav Brain Res.* 2001 Nov 1;125(1-2):151-7.

FIUME, M.; BERGFELD, W.F.; BELSITO, D.V.; HILL, R.A.; KLAASSEN, C.D.; LIEBLER, D.C.; MARKS, J.G.; SHANK, R.C.; SLAGA, T.J.; SNYDER, P.W.; HELDRETH, B. **Squalane and Squalene**. *Int J Toxicol*. 2023 Dec;42(3_suppl):107S-109S.

FRANCO, N.H. **Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective**. Basel: Animals, 2013 Mar 19;3(1):238-73.

FRANCO, N.H.; KERTON, A.; LEWIS, D.I. **Education in laboratory animal science and the 3Rs**. *Lab Anim*. 2023 Apr;57(2):109-111.

FREIRES IA, SARDI JC, DE CASTRO RD, ROSALEN PL. **Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden?** *Pharm Res*. 2017 Apr;34(4):681-686.

GABÁS-RIVERA, C.; BARRANQUERO, C.; MARTÍNEZ-BEAMONTE, R.; NAVARRO, M.A.; SURRA, J.C.; OSADA, J. **Dietary squalene increases high density lipoprotein-cholesterol and paraoxonase 1 and decreases oxidative stress in mice**. *PLoS One*. 2014 Aug 12;9(8):e104224. doi: 10.1371/journal.pone.0104224. PMID: 25117703; PMCID: PMC4130590.

GABÁS-RIVERA, C.; JURADO-RUIZ, E.; SÁNCHEZ-ORTIZ, A.; ROMANOS, E.; MARTÍNEZ-BEAMONTE, R.; NAVARRO, M.A.; SURRA, J.C.; ARNAL, C.; RODRÍGUEZ-YOLDI, M.J.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; OSADA, J. **Dietary Squalene Induces Cytochromes Cyp2b10 and Cyp2c55 Independently of Sex, Dose, and Diet in Several Mouse Models**. *Mol Nutr Food Res*. 2020 Oct;64(20):e2000354.

GARCIA-BERMUDEZ, J.; BAUDRIER, L.; BAYRAKTAR, E.C.; SHEN, Y.; LA, K.; GUARECUCO, R.; YUCEL, B.; FIORE, D.; TAVORA, B.; FREINKMAN, E.; CHAN, S.H.; LEWIS, C.; MIN, W.; INGHIRAMI, G.; SABATINI, D.M.; BIRSOY, K. **Squalene accumulation in cholesterol auxotrophic lymphomas prevents oxidative cell death**. *Nature*, 2019 Mar;567(7746):118-122. doi: 10.1038/s41586-019-0945-5. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30760928; PMCID: PMC6405297.

GARNER, J.P.; GASKILL, B.N.; WEBER, E.M.; AHLOY-DALLAIRE, J.; PRITCHETT-CORNING, K.R. **Introducing Therioepistemology: the study of how knowledge is gained from animal research**. Nova Yorque: Lab Anim (NY). 2017 Mar 22;46(4):103-113. doi: 10.1038/labanim.1224. PMID: 28328885.

GONZALES, C.; ZALESKA, M.M.; RIDDELL, D.R.; et al. **Alternative method of oral administration by peanut butter pellet formulation results in target engagement of BACE1 and attenuation of gavage-induced stress responses in mice**. *Pharmacol Biochem Behav* 2014; 126: 28–35.

GUILLÉN, N.; ACÍN, S.; NAVARRO, M.A.; PERONA, J.S.; ARBONÉS-MAINAR, J.M.; ARNAL, C.; SARRÍA, A.J.; SURRA, J.C.; CARNICER, R.; ORMAN, I.; SEGOVIA, J.C.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V.; OSADA, J. **Squalene in a sex-dependent manner modulates atherosclerotic lesion which correlates with hepatic fat content in apoE-knockout male mice**. *Atherosclerosis*. 2008 Mar;197(1):72-83.

GRIESINGER C, DESPREZ B, COECKE S, CASEY W, ZUANG V. **Validation of Alternative In Vitro Methods to Animal Testing: Concepts, Challenges, Processes and Tools.** *Adv Exp Med Biol.* 2016;856:65-132.

GVAZAVA, I.G.; KARIMOVA, M.V.; VASILIEV, A.V.; VOROTELYAK, E.A. **Type 2 Diabetes Mellitus: Pathogenic Features and Experimental Models in Rodents.** *Acta Naturae.* 2022 Jul-Sep;14(3):57-68. doi: 10.32607/actanaturae.11751. PMID: 36348712; PMCID: PMC9611859.

HEREDIA-ANTÚNEZ A, GALARDE-LÓPEZ M, TÉLLEZ-BALLESTEROS E, VANDA-CANTÓN B. **Knowledge, Attitudes, and Practices on Ethics in Biomedical Animal Research in Mexico.** *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2023 Nov 11;62(6):478-486.

HERRERA-MARCOS, L.V.; MARTÍNEZ-BEAMONTE, R.; ARNAL, C.; BARRANQUERO, C.; PUENTE-LANZAROTE, J.J.; HERRERO-CONTINENTE, T.; LOU-BONAFONTE, J.M.; GONZALO-ROMEO, G.; MOCCIARO, G.; JENKINS, B.; SURRA, J.C.; RODRÍGUEZ-YOLDI, M.J.; BURILLO, J.C.; LASHERAS, R.; GARCÍA-GIL, A.; GÜEMES, A.; KOULMAN, A.; OSADA, J. **Dietary squalene supplementation decreases triglyceride species and modifies phospholipid lipidomic profile in the liver of a porcine model of non-alcoholic steatohepatitis.** *J Nutr Biochem,* 2023 Feb;112:109207

HIMANSHU; DHARMILA, SARKAR D.; NUTAN. **A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects.** *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2020 Aug 31;18(3):341-351. doi: 10.9758/cpn.2020.18.3.341. PMID: 32702213; PMCID: PMC7382999.

HUYNH, N.; ARABIAN, N.; LIEU, D.; ASATRYAN, L.; DAVIES, D.L. **Utilizing an Orally Dissolving Strip for Pharmacological and Toxicological Studies: A Simple and Humane Alternative to Oral Gavage for Animals.** *J Vis Exp.* 2016;(109):e53770. Published 2016 Mar 23. doi:10.3791/53770.

IBRAHIM, N.; FAIRUS, S.; ZULFARINA, M.S.; NAINA, Mohamed I. **The Efficacy of Squalene in Cardiovascular Disease Risk-A Systematic Review.** *Nutrients.* 2020 Feb 5;12(2):414.

IBRAHIM N.; NAINA, Mohamed I. **Interdependence of Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Squalene-Implication for Cardiovascular Health.** *Basel: Life,* 2021 Jan 29;11(2):103.

JONES, C.P.; BOYD, K.L.; WALLACE, J.M. **Evaluation of mice undergoing serial oral gavage while awake or anesthetized.** *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2016; 55: 805–810.

KINTER LB, DEHAVEN R, JOHNSON DK, DEGEORGE JJ. **A Brief History of Use of Animals in Biomedical Research and Perspective on Non-Animal Alternatives.** *ILAR J.* 2021 Dec 31;62(1-2):7-16

KIM, S.K.; KARADENIZ, F. **Biological importance and applications of squalene and squalane.** Adv Food Nutr Res. 2012;65:223-33.

KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. **Elevated plus maze for mice.** J Vis Exp. 2008 Dec 22;(22):1088. doi: 10.3791/1088. PMID: 19229173; PMCID: PMC2762911.

KÜSTER, T.; ZUMKEHR, B.; HERMANN, C.; THEURILLAT, R.; THORMANN, W.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. **Voluntary ingestion of antiparasitic drugs emulsified in honey represents an alternative to gavage in mice.** J Am Assoc Lab Anim Sci. 2012 Mar;51(2):219-23.

LEWIS, D.I. **Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs.** Emerg Top Life Sci. 2019 Nov 27;3(6):675-679.

LUCAS, F.; SCLAFANI, A. **Food deprivation increases the rat's preference for a fatty flavor over a sweet taste.** Chem Senses. 1996 Apr;21(2):169-79.

MA, S. **Experimental models for preclinical cancer research.** Exp Cell Res. 2023 Aug 1;429(1):113643.

MARTÍNEZ-BEAMONTE, R.; ALDA, O.; SANCLEMENTE, T.; FELICES, M.J.; ESCUSOL, S.; ARNAL, C.; HERRERA-MARCOS, L.V.; GASCÓN, S.; SURRA, J.C.; OSADA, J.; RODRÍGUEZ-YOLDI, M.J. **Hepatic subcellular distribution of squalene changes according to the experimental setting.** J Physiol Biochem. 2018 Nov;74(4):531-538.

MARTÍNEZ-BEAMONTE, R.; SÁNCHEZ-MARCO, J.; FELICES, M.J.; BARRANQUERO, C.; GASCÓN, S.; ARNAL, C.; BURILLO, J.C.; LASHERAS, R.; BUSTO, R.; LASUNCIÓN, M.A.; RODRÍGUEZ-YOLDI, M.J.; OSADA, J. **Dietary squalene modifies plasma lipoproteins and hepatic cholesterol metabolism in rabbits.** Food Funct. 2021 Sep 7;12(17):8141-8153.

MARTINS, T.; MATOS, A.F.; SOARES, J.; LEITE, R.; PIRES, M.J.; FERREIRA, T.; MEDEIROS-FONSECA, B.; ROSA E, OLIVEIRA, P.A.; ANTUNES, L.M. **Comparison of Gelatin Flavors for Oral Dosing of C57BL/6J and FVB/N Mice.** J Am Assoc Lab Anim Sci. 2022 Jan 1;61(1):89-95.

MARX, J.O.; JACOBSEN, K.O.; PETERVARY, N.A.; CASEBOLT, D.B. **A Survey of Laboratory Animal Veterinarians Regarding Mouse Welfare in Biomedical Research.** J Am Assoc Lab Anim Sci. 2021 Mar 1;60(2):139-145.

MCDONNELL-DOWLING, K.; KLEEFELD, S.; KELLY, J.P. **Consequences of Oral Gavage during Gestation and Lactation on Rat Dams and the Neurodevelopment and Behavior of Their Offspring.** J Am Assoc Lab Anim Sci. 2017 Jan 1;56(1):79-83.

MICERA, M.; BOTTO, A.; GEDDO, F.; ANTONIOTTI, S.; BERTEA, C.M.; LEVI, R.; GALLO, M.P.; QUERIO, G. **Squalene: More than a Step toward Sterols.** Basel: Antioxidants, 2020 Aug 2;9(8):688.

MODLINSKA, K; CHRZANOWSKA, A.; PISULA, W. **Variability of enriched environment does not enhance the enrichment effect on food neophobia in rats (*Rattus norvegicus*)**. Behav Processes. 2020 Nov;180:104221

NAZIRI, E.; TSIMIDOU, M.Z. **Formulated squalene for food related applications**. Recent Pat Food Nutr Agric. 2013 Aug;5(2):83-104. doi: 10.2174/1876142911305020001. PMID: 23270393.

Nutrient Requirements of Laboratory Animals Fourth Revised Edition, 1995. National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Washington (DC): National Academies Press (US); 1995.ISBN-10: 0-309-05126-6.

PANDAMOOZ, S.; JUREK, B.; MEINUNG, C.P.; BAHARVAND, Z.; SAHEBI, Shahem-Abadi A.; HAERTEIS, S.; MIYAN, J.A.; DOWNING, J.; DIANATPOUR, M.;

BORHANI-HAGHIGHI, A.; SALEHI, M.S. **Experimental Models of SARS-CoV-2 Infection: Possible Platforms to Study COVID-19 Pathogenesis and Potential Treatments**. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2022 Jan 6;62:25-53.

PETETTA, F.; CICCOCIO PPO, R. **Public perception of laboratory animal testing: Historical, philosophical, and ethical view**. Addict Biol. 2021 Nov;26(6):e12991. POOLE, T. **Happy animals make good science**. Lab Anim. 1997 Apr;31(2):116-24. doi: 10.1258/002367797780600198. PMID: 9175008.

POPA, O.; BĂBEANU, N.E.; POPA, I.; NIȚĂ, S.; DINU-PÂRVU, C.E. **Methods for obtaining and determination of squalene from natural sources**. Biomed Res Int. 2015; 2015: 367202.

PRADILLO, J.M.; GARCÍA-CULEBRAS, A.; CUARTERO, M.I.; PEÑA-MARTÍNEZ, C.; MORO, M.A.; LIZASOAIN, I.; MORAGA, A. **Del laboratorio a la clínica en elictus isquémico agudo**. Modelos experimentales in vitro e in vivo [From the laboratory to the clinic in acute ischaemic stroke. In vitro and in vivo experimental models]. Rev Neurol. 2022 Nov 1;75(9):283-293.

RAMOS-TOVAR, E.; HERNÁNDEZ-AQUINO, E.; CASAS-GRAJALES, S.; BUENDIA-MONTAÑO, L.D.; GALINDO-GÓMEZ, S.; CAMACHO, J.; TSUTSUMI, V.; MURIEL, P. **Stevia Prevents Acute and Chronic Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride by Blocking Oxidative Stress through Nrf2 Upregulation**. Oxid Med Cell Longev. 2018 Apr 19;2018:3823426.

RAYA, J.; GIRARDI, C.E.N.; HIPÓLIDE, D.C. **Corticosterone Assimilation by a Voluntary Oral Administration in Palatable Food to Rats**. J Appl Anim Welf Sci. 2019 Jan-Mar;22(1):37-41.

RIEBELING C, LUCH A, TRALAU T. **Skin toxicology and 3Rs-Current challenges for public health protection**. Exp Dermatol. 2018 May;27(5):526-536.

RUVIRA, S.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, P.; CAÑAS, S.; RAMIRO-CORTIJO, D.; AGUILERA, Y.; MUÑOZ-VALVERDE, D.; ARRIBAS, S.M. **Evaluation of Parameters Which Influence Voluntary Ingestion of Supplements in Rats**. Animals (Basel), 2023 May 31;13(11):1827.

SAMUEL, P.; AYOOB, K.T.; MAGNUSON, B.A.; WÖLWER-RIECK, U.; JEPPESEN, P.B.; ROGERS, P.J.; ROWLAND, I.; MATHEWS, R. **Stevia Leaf to Stevia Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential.** J Nutr. 2018 Jul 1;148(7):1186S-1205S. doi: 10.1093/jn/nxy102. PMID: 29982648.

SCARBOROUGH, Joseph; MUELLER Flavia; ARBAN, Roberto; DORNER-CIOSSEK Cornelia; WEBER-STADLBAUER, Ulrike; ROSENBROCK, Holger; MEYER, Urs; RICETTO, Juliet. **Preclinical validation of the micropipette-guided drug administration (MDA) method in the maternal immune activation model of neurodevelopmental disorders.** Brain, Behavior, and Immunity, Volume 88, 2020, Pages 461-470, ISSN 0889-1591.

SCLAFANI, A; ACKROFF, K. **Flavor preferences conditioned by nutritive and non-nutritive sweeteners in mice.** Physiol Behav. 2017 May 1;173:188-199. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.02.008. Epub 2017 Feb 10. PMID: 28192132; PMCID: PMC5357161.

SCLAFANI, A. **Enhanced sucrose and Polycose preference in sweet "sensitive" (C57BL/6J) and "subsensitive" (129P3/J) mice after experience with these saccharides.** Physiol Behav. 2006 Apr 15;87(4):745-56. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.01.016. Epub 2006 Mar 9. PMID: 16529783.

SCLAFANI, A. **Fat and sugar flavor preference and acceptance in C57BL/6J and 129 mice: experience attenuates strain differences.** Physiol Behav. 2007 Mar 16;90(4):602-11. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.11.012. Epub 2007 Jan 8. PMID: 17210165.

SCOLASTICI, C.; ONG, T.P.; MORENO, F.S. **Squalene does not exhibit a chemopreventive activity and increases plasma cholesterol in a Wistar rat hepatocarcinogenesis model.** Nutr Cancer, 2004;50(1):101-9.

SEIBENHENER, M.L.; WOOTEN, M.C. **Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice.** J Vis Exp. 2015 Feb 6;(96):e52434. doi: 10.3791/52434. PMID: 25742564; PMCID: PMC4354627.

SHIMIZU, N., ITO, J.; KATO, S.; EITSUKA, T.; MIYAZAWA, T.; NAKAGAWA, K. **Significance of Squalene in Rice Bran Oil and Perspectives on Squalene Oxidation.** J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2019;65(Supplement):S62-S66. doi: 10.3177/jnsv.65.S62. PMID: 31619649.

SMITH, J.C.; SCLAFANI, A. **Saccharin as a sugar surrogate revisited.** Appetite. 2002 Apr;38(2):155-60. doi: 10.1006/appe.2001.0467. PMID: 12027377.

STRANDBERG, T.E.; TILVIS, R.S.; MIETTINEN, T.A. **Variations of hepatic cholesterol precursors during altered flows of endogenous and exogenous squalene in the rat.** Biochim. Biophys. Acta, 1989, 1001, 150–156.

SU, E.; ZHANG, N.N.; HO, P.C. **Determination of tributyrin and its metabolite butyrate in Wistar rat plasma samples by gas chromatography/mass spectrometry.** Mass Spectrometry 2004; 18: 2217-2222.

TATEM, K.S.; QUINN, J.L.; PHADKE, A.; YU, Q.; GORDISH-DRESSMAN, H.; NAGARAJU, K. **Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases.** J Vis Exp. 2014 Sep 29;(91):51785. doi: 10.3791/51785. PMID: 25286313; PMCID: PMC4672952.

TAYLOR, B.F.; RAMIREZ, H.E.; BATTLES, A.H.; ANDRUTIS, K.A.; NEUBERT, J.K. **Analgesic Activity of Tramadol and Buprenorphine after Voluntary Ingestion by Rats (*Rattus norvegicus*).** J Am Assoc Lab Anim Sci. 2016 Jan;55(1):74-82. PMID: 26817983; PMCID: PMC4747014.

TEIXEIRA-SANTOS, L.; ALBINO-TEIXEIRA, A.; PINHO, D. **An alternative method for oral drug administration by voluntary intake in male and female mice.** Lab Anim. 2021 Feb;55(1):76-80. doi: 10.1177/0023677220950782. Epub 2020 Sep 3. PMID: 32883167.

TILVIS, R.S.; MIETTINEN, T.A. **Absorption and metabolic fate of dietary 3H-squalene in the rat.** Lipids, 1983 Mar;18(3):233-8. A.

TILVIS, R.S.; MIETTINEN, T.A. **Dietary squalene increases tissue sterols and fecal bile acids in the rat.** Lipids, 1983 Jan;18(1):32-6. B.

TURNER, P.V.; VAUGHN, E.; SUNOHARA, J.; JUNKIN, A.; OVARI, J.; LERI, F. 2011. **Oral gavage in rats: an animal welfare issue?** J Am Assoc Lab Anim Sci In press.

TURNER, P.V.; VAUGHN E.; SUNOHARA-NEILSON, J.; OVARI, J.; LERI, F. **Oral gavage in rats: animal welfare evaluation.** J Am Assoc Lab Anim Sci. 2012;51(1):25-30.

WANGE RL, BROWN PC, DAVIS-BRUNO KL. **Implementation of the principles of the 3Rs of animal testing at CDER: Past, present and future.** Regul Toxicol Pharmacol. 2021 Jul;123:104953.

WALKER, M.K.; BOBERG, J.R.; WALSH, M.T.; WOLF, V.; TRUJILLO, A.; DUKE, M.S.; PALME, R.; FELTON, L.A. **A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice.** Toxicol Appl Pharmacol. 2012 Apr 1;260(1):65-9. doi: 10.1016/j.taap.2012.01.025. Epub 2012 Feb 2. PMID: 22326784; PMCID: PMC3306547.

WARREN, M.R.; RADULESCU, A.; DORNBOS, P.; CUOMO, D.; ZUMWALT, S.; BUESO-MENDOZA, D.; NITCHER, M.; LAPRES, J.J.; THREADGILL, D.W.

Peanut

butter as an alternative dose delivery method to prevent strain-dependent orogastric gavage-induced stress in mouse teratogenicity studies. J Pharmacol Toxicol Methods, 2021 Jan-Feb;107:106948.

ZHANG, S.; YE, B.; ZENG, L.; CHEN, Y.; HE, S.; WANG, C.; LI, X.; ZHAO, J.; SHI, M.; WANG, L.; LI, H.; CHENG, J.; WANG, W.; LU, Y. **Drug-containing gelatin treats as an alternative to gavage for long-term oral administration in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*).** J Am Assoc Lab Anim Sci. 2012 Nov;51(6):842-6.