



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO
MESTRADO PROFISSIONAL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

TAYNARA MARTINS MOURA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO PROCESSO DE CONGELAMENTO NOS
PARÂMETROS MACRO E MICROSCÓPICOS TEGUMENTARES DO BIOMODELO**
Macaca mulatta (Zimmermann, 1780)

Rio de Janeiro

2021

TAYNARA MARTINS MOURA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO PROCESSO DE CONGELAMENTO NOS
PARÂMETROS MACRO E MICROSCÓPICOS TEGUMENTARES DO BIOMODELO
Macaca mulatta (Zimmermann, 1780)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – Fiocruz/RJ, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência em Animais de Laboratório.

Orientadora: Prof^ª Dra. Cláudia Andréa de Araújo Lopes
Coorientadora: Prof^ª Dra. Kelly Cristina Demarque

Rio de Janeiro

2021

Moura, Taynara Martins.

Avaliação do Impacto do Processo de Congelamento nos Parâmetros Macro e Microscópicos Tegumentares no Biomodelo *Macaca mulatta* (ZIMMERMANN, 1780) / Taynara Martins Moura. - Rio de Janeiro, 2021.

115 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2021.

Orientadora: Cláudia Andréa de Araújo Lopes.

Co-orientadora: Kelly Cristina Demarque.

Bibliografia: f. 106-113

1. Primatas não humanos. 2. Histologia. 3. Pele. 4. Preservação tecidual.

I. Título.

TAYNARA MARTINS MOURA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO PROCESSO DE CONGELAMENTO NOS
PARÂMETROS MACRO E MICROSCÓPICOS TEGUMENTARES DO BIOMODELO
Macaca mulatta (Zimmermann, 1780)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – Fiocruz/RJ, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciência em Animais de Laboratório.

Aprovada em: Rio de Janeiro, 17 de Novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA:



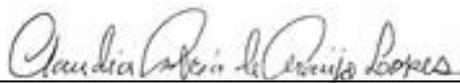
Prof^ª Dra Márcia Cristina Ribeiro Andrade - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB)/Fiocruz, RJ

Documento assinado digitalmente
 CLARICE MACHADO DOS SANTOS
Data: 28/03/2022 17:29:33-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

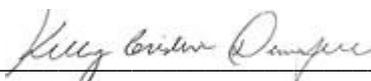
Prof^ª Dra. Clarice Machado dos Santos - Instituto Biomédico, UFF, RJ



Prof^ª Dra. Marcela Freire Vallim de Mello – Faculdade de Veterinária, UFF, RJ



Prof^ª Dra Cláudia Andréa Araújo Lopes - ICTB/FIOCRUZ
Orientadora



Prof^ª Dra Kelly Cristina Demarque - IOC/FIOCRUZ
Coorientadora

Dedicatória

A Deus, por ter tornado real este objetivo tão almejado, minha eterna gratidão a Ele!

À minha querida mãe, por todo o seu apoio, compreensão e ajuda durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem Ele eu com certeza não teria conseguido chegar até aqui. Ele me deu forças nos momentos mais difíceis e angustiantes que enfrentei ao longo do caminho, guiando-me em todos os meus passos.

À minha querida orientadora, Dra Cláudia Andréa de Araújo Lopes, por me aceitar como sua orientanda e muito mais que isso, hoje tenho uma amiga, a qual tenho profundo carinho, respeito e admiração. Agradeço pelas orientações, pelo apoio, pelos conselhos e por sempre ter sido presente, mesmo em plena pandemia que vivenciamos, tendo acreditado no meu potencial desde o início.

À minha querida coorientadora, Dra Kelly Cristina Demarque, excepcional e dedicada patologista, o meu muito obrigada por compartilhar um pouco do seu conhecimento comigo. Obrigada pela paciência, por sempre estar disposta a me ensinar de uma forma tão brilhante. Não poderia deixar de mencionar suas palavras de apoio e incentivo ao longo de todo esse período, que fizeram toda a diferença para mim.

À Coordenação de Mestrado Profissional em Ciência em Animais de Laboratório – MPCAL-ICTB, curso de referência no Brasil em sua área de atuação. Agradeço à toda a equipe e, em especial, à Dra Maria Inês Doria Rossi, por suas sugestões e correções que ajudaram a enriquecer este trabalho.

À toda equipe da Coordenação de Pesquisa e Experimentação Animal (CPEA/ICTB/FIOCRUZ), por todo o amparo no decorrer deste período. Um agradecimento especial ao médico veterinário responsável pelo Laboratório de Histotécnica da CPEA, Igo Vieira Souza e ao colega Jhonata Nascimento, que tiveram um papel importante no meu aprendizado e execução das técnicas laboratoriais. À estimada Coordenadora Dra Márcia Cristina Ribeiro Andrade, cientista excepcional que atua no desenvolvimento de pesquisas com primatas não humanos e que contribuiu fortemente para a execução deste trabalho.

À equipe do Serviço de Criação de Primatas não Humanos (SCPrim/ICTB/FIOCRUZ), que contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente à Dra Tatiana Kugelmeier, por gentilmente ter colaborado com a execução deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Biologia Celular do IOC (FIOCRUZ), pelo apoio recebido.

Aos amigos da turma de mestrado 2019, Suzana Fernandes, Danielle Forneas, Maria Carolina, Cláudio Marcelo e Gabriel Moreira, pelo companheirismo, risadas e bons momentos compartilhados.

A todos os professores que compõem o corpo docente do Programa do MPCAL (ICTB/FIOCRUZ), por dedicarem parte do seu tempo transmitindo seus nobres conhecimentos e experiências nas diferentes áreas da Ciência em Animais de Laboratório.

À Dra Klena Sarges, pela parceria e contribuição para a execução deste trabalho.

À Margarida Ribeiro, Júlia Faber e Bárbara Lemos, pelo apoio na coleta do material para a utilização deste trabalho, por toda colaboração técnica durante as atividades realizadas, bem como pela amizade expressada.

Finalmente, à minha família, minha base de todos os momentos. Quero agradecer em especial à minha mãe, Marilene Martins Moura, minha eterna gratidão por todo o seu apoio, sua dedicação e por sempre me incentivar a ser uma pessoa melhor. Ao meu saudoso pai, Davi de Oliveira Moura (*In memoriam*) por suas lições de vida ensinadas que levarei sempre comigo. Ao meu namorado e amigo de todos os momentos, Igor Thiago de Farias Pessoa Côrtes, muito obrigada por seu carinho, apoio, incentivo e compreensão nesta trajetória.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”

Maria Curie

RESUMO

O uso de primatas não humanos (PNH) em pesquisas constitui ferramenta excepcional no conhecimento sobre inúmeras patologias que afetam os humanos. É imperioso que o seu emprego como biomodelos esteja em consonância com as normas vigentes. Neste intuito, o estudo morfológico das diferentes espécies envolvidas na Ciência em Animais de Laboratório (CAL) é de extrema relevância para a evolução do processo científico. Em criadouros científicos, em situações em que esses animais têm como desfecho o óbito, muitas vezes, não há possibilidade de realizar um exame necroscópico imediato, havendo a necessidade de congelar a carcaça do animal para posterior análise. Diante dessa abordagem, este trabalho objetivou descrever a estrutura morfológica de diferentes regiões anatômicas do sistema tegumentar de macacos rhesus (*Macaca mulatta*), verificar a influência do congelamento na arquitetura celular, bem como estudar potenciais efeitos autolíticos do tecido cutâneo. Os animais foram divididos em três grupos: G1 - animais submetidos à eutanásia, tendo sido feita a necropsia imediatamente; G2 - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados a -20°C ; e G3 - animais que vieram ao óbito e expostos a condições ambientais por até 24h e congelados a -20°C . Foram coletadas seis regiões do tegumento: parietal superior medial, cervical posterior, torácica intermamária, torácica interescapular, ventral quadrante esquerdo inferior e sacral. As amostras foram processadas por técnicas histológicas habituais de inclusão em parafina e coradas pelo método Hematoxilina-Eosina, mensurando 30 regiões da epiderme e 30 regiões da camada córnea da epiderme, de forma randomizada. A quantificação do colágeno na derme foi feita pelo método Picrosírius Red, com captura de 20 regiões da derme. Os resultados mostraram que o processo de congelamento foi capaz de preservar as carcaças dos animais dos grupos G2 e G3, sem alterações histopatológicas, com exceção das regiões ventral e cervical. Evidenciou-se uma tendência de dermatite nas regiões palmar, plantar e calosidade isquiática, constatando-se que estas não são consideradas regiões viáveis para submissão de estudo histológico. Os achados sugerem que o congelamento é um importante processo de preservação do sistema tegumentar e, é possível coletar amostras deste sistema no período de até 24 horas *post mortem* em temperatura ambiente, devendo-se, entretanto, evitar as regiões ventral e cervical devido a alterações significativas que ocorrem nestas regiões.

Palavras-chave: Primatas não humanos. Histologia. Pele. Preservação tecidual.

ABSTRACT

The use of nonhuman primates (NHP) in research is an exceptional tool in the knowledge of pathologies that affect humans. It is imperative that their use as biomodels is in line with current regulations. In this regard, the morphological study of the different species involved in Laboratory Animal Science (LAS) is extremely important to the evolution of the scientific process. In scientific breeding sites, in situations where these animals have death as an outcome, there is often no possibility of carrying out an immediate necroscopic examination, with the need to freeze the animal's carcass for further analysis. Given this approach and considering that the integument is the largest organ of living organisms, this study aimed to describe the morphological structure of different anatomical regions of the integumentary system of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), to verify the influence of freezing on the skin cell architecture of these animals, as well as to study potential autolytic effects of the cutaneous tissue. The animals were divided into three groups: G1 - animals that were submitted to euthanasia and the necropsy was performed immediately; G2 - animals that were submitted to euthanasia and immediately frozen at -20°C , for subsequent necroscopic analysis; and G3 - animals that died and exposed to environmental conditions for up to 24 hours and then frozen at -20°C . Six regions of the integument were collected: medial superior parietal, posterior cervical, intermammary thoracic, interscapular thoracic, ventral left inferior quadrant and sacral. Samples were processed by usual histological techniques of embedding in paraffin and stained by the Hematoxylin-Eosin method, measuring 30 regions of the epidermis and stratum corneum in a random way. The collagen quantification in the dermis was performed using the Picrosirius Red method, capturing 20 regions of the dermis. Results showed that the freezing process was able to preserve the animal carcasses in G2 and G3 groups, with no histopathological changes, except for the ventral and cervical regions. A trend of dermatitis was evidenced in the palmar, plantar and sciatic callosity regions, noting that these are not considered viable regions for histological study submission. The findings suggest that freezing is an important preservation process for the integumentary system, and that it is possible to collect samples from this system up to 24 hours *post mortem* at room temperature. However, the ventral and cervical regions should be avoided due to the significant changes that occur in these regions.

Keywords: Non-human primates. Histology. Skin. Tissue preservation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição geográfica da espécie <i>Macaca mulatta</i>	21
Figura 2: <i>Macaca mulatta</i> (A) e <i>Saimiri sciureus</i> (B), respectivamente.....	22
Figura 3: Macaco rhesus (<i>Macaca mulatta</i>) macho (A) e fêmea (B) com seu filhote.....	24
Figura 4: Pele fina da região ventral quadrante inferior esquerdo de macaco rhesus (<i>Macaca mulatta</i>).....	28
Figura 5: Esquema representativo (A) e Fotomicrografia (B) evidenciando os estratos basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córnea da epiderme.....	29
Figura 6: Sex skin em <i>Macaca mulatta</i>	35
Figura 7: Calos isquiáticos em <i>Macaca mulatta</i>	36
Figura 8: Coleta do material biológico para análise.....	47
Figura 9: Fotomicrografia representativa das técnicas de coloração histológica H&E (A) e Picrossírius Red (B).....	48
Figura 10: Fotomicrografia representativa da mensuração da epiderme e da camada córnea.....	51
Figura 11: Grau de alterações da macroscópicas da pele entre os grupos experimentais do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	55
Figura 12: Pseudomelanose da região abdominal e <i>livor mortis</i> na pele da região inguinal e face interna das coxas da espécie <i>Macaca mulatta</i>	56
Figura 13: Pele fina (Torácica intermamária) e pele espessa (Calosidade isquiática) do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	58
Figura 14: Pele grossa da região palmar do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	59
Figura 15: Pele das regiões calosidade isquiática: (A) e região sacral do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	60
Figura 16: Pele das regiões cervical posterior (A) e parietal superior medial (B) e (C) do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	61
Figura 17: Pele da região parietal superior medial do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	62

Figura 18: Pele da região sacral do biomodelo <i>Macaca Mulatta</i>	63
Figura 19: Pele grossa da região palmar do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	64
Figura 20: Casos de dermatite encontrados no biomodelo estudado	
<i>Macaca mulatta</i>	66
Figura 21: Percentual de casos de dermatite nas regiões tegumentares de <i>Macaca mulatta</i> avaliados no estudo.....	67
Figura 22: Diferentes escores corporais encontrados nas carcaças estudadas de <i>Macaca mulatta</i>	71
Figura 23: Fotomicrografia representativa da frequência de compactação da camada córnea.....	71
Figura 24: Fotomicrografia representativa do grau de destacamento da camada córnea.....	72
Figura 25: Fotomicrografia representativa do grau de condensação basofílica.....	74
Figura 26: Fotomicrografia representativa do grau de perda da morfologia basal da epiderme.....	76
Figura 27: Análise histopatológica da região ventral relacionada ao grau de degeneração hidrópica da epiderme do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	77
Figura 28: Fotomicrografia representativa do grau de degeneração Hidrópica.....	78
Figura 29: Grau de degeneração hidrópica X condensação basofílica.....	81
Figura 30: Fotomicrografia representativa da relação entre a condensação basofílica e a degeneração hidrópica.....	82
Figura 31: Análise histomorfométrica da região sacral relacionada espessura da epiderme do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	83
Figura 32: Fotomicrografia representativa da espessura da epiderme referente a região sacral entre os grupos G1 e G2.....	84
Figura 33: Avaliação da região cervical da camada córnea da epiderme do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	85

Figura 34: Fotomicrografia representativa da diferença de espessura da camada córnea da região cervical.....	86
Figura 35: Percentual de colágeno dérmico presente da região ventral quadrante inferior esquerdo do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	89
Figura 36: Fotomicrografia representativa do percentual de colágeno dérmico presente na região ventral quadrante inferior esquerdo.....	90
Figura 37: Relação da temperatura e da quantificação do percentual de colágeno presente da derme da região ventral do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	92
Figura 38: Relação da umidade e da quantificação do percentual de colágeno presente da derme da região cervical do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	93
Figura 39: Relação entre a espessura da epiderme e as diferentes regiões anatômicas no biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	94
Figura 40: Relação entre a espessura da camada córnea e as diferentes regiões anatômicas no biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação quanto ao percentual das alterações macroscópicas <i>post mortem</i> da pele da espécie <i>Macaca mulatta</i>	54
Tabela 2: Avaliação quanto ao percentual de presença da camada córnea na espécie <i>Macaca mulatta</i>	70
Tabela 3: Frequência de compactação da camada córnea entre os grupos da espécie <i>Macaca mulatta</i>	71
Tabela 4: Avaliação quanto ao grau de destacamento da camada córnea no biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	73
Tabela 5: Avaliação quanto ao grau de condensação basofílica do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	75
Tabela 6: Avaliação quanto ao grau de perda da morfologia basal da epiderme do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	75
Tabela 7: Avaliação quanto ao grau de degeneração hidrópica dos grupos experimentais do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	79
Tabela 8: Avaliação quanto ao grau de topografia da degeneração hidrópica no biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	80
Tabela 9: Espessura da epiderme no biomodelo <i>Macaca mulatta</i> (estatística descritiva e valor de p pela ANOVA).....	84
Tabela 10: Espessura da camada córnea da epiderme do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	87
Tabela 11: Média e desvio padrão da média do percentual de colágeno presente na dermeda espécie <i>Macaca mulatta</i>	

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Distribuição taxonômica da espécie <i>Macaca mulatta</i> (macaco rhesus).....	23
Quadro 2: Dados dos animais incluídos no estudo do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	46
Quadro 3: Parâmetros macroscópicos para avaliação do sistema tegumentar de PNH.....	49
Quadro 4: Parâmetros microscópicos para avaliação do sistema tegumentar de PNH.....	50
Quadro 5: Percentual de casos de dermatite avaliados nos animais do estudo (<i>Macaca Mulatta</i>).....	65
Quadro 6: Análise descritiva de regressão simples relacionados à variação de idade da epiderme e da camada córnea dentro do grupo experimental de <i>Macaca mulatta</i>	68
Quadro 7: Análise descritiva de regressão simples relacionados à variação do escore corporal.....	68
Quadro 8: Relação entre a temperatura e a umidade relativa com os dias do óbito dos animais do grupo G3 do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	88
Quadro 9: Influência da temperatura no dia do óbito dos animais do grupo G3 como parâmetro de avaliação sobre a espessura da epiderme e da camada córnea do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	88
Quadro 10: Influência da umidade relativa referente ao dia do óbito dos animais do grupo G3 como parâmetro de avaliação sobre a espessura da epiderme e da camada córnea do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	89
Quadro 11: Influência da temperatura no dia do óbito dos animais do G3 como parâmetro de avaliação quanto ao percentual de colágeno dérmico no biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	91
Quadro 12: Influência da umidade no dia do óbito dos animais do grupo G3 como parâmetro de avaliação quanto ao percentual de colágeno dérmico do biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PNH – Primatas não humanos

CAL – Ciência em Animais de Laboratório

CONCEA – Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal

IPSC – *Interagency Primate Steering Committee*

CPEA – *Coordenação de Pesquisa e Experimentação Animal*

IPM – Intervalo *post mortem*

SCPrim – Serviço de Criação de Primatas Não Humanos

ICTB – Instituto de Ciência e tecnologia em Biomodelos

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

3Rs - Replacement, Reduction, Refinement

EP – Epiderme

CO – Camada córnea

PA – Região parietal medial

CE – Região cervical posterior

TORIM – Região torácica intermamária

TORES – Região torácica interescapular

SA – Região sacral

VE – Região ventral quadrante posterior esquerdo inferior

PL – Região palmar

PT – Região plantar

CI – Calosidade isquiática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 O uso de primatas não humanos em ciência.....	20
2.2 Classificação taxonômica.....	20
2.3 Princípio dos 3 Rs na pesquisa científica com PNH	25
2.4 A importância do conhecimento morfológico na pesquisa científica do sistema tegumentar em PNH.....	26
2.5 O Sistema tegumentar de PNH.....	27
2.6 O calendário tanatológico e o sistema tegumentar	36
2.7 O Impacto do tempo de congelamento na morfologia do sistema tegumentar.....	41
3. JUSTIFICATIVA	43
4. OBJETIVOS.....	44
4.1 Objetivos gerais	44
4.2 Objetivos específicos.....	44
5. MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1 Princípios éticos	45
5.2 Animais	45
5.2 Coleta das amostras	47
5.3 Análise macroscópica do sistema tegumentar.....	48
5.4 Viabilidade das amostras para inclusão dentro do estudo histológico	49
5.5 Histopatologia tegumentar	49
5.7 Quantificação de fibra colágeno.....	52
5.8 Fatores de interferência no processo de decomposição após a morte	52
5.9 Elaboração do atlas digital de histologia de PNH	52
5.10 Análise estatística.....	53
6. RESULTADOS	54
6.1 Macroscopia	54
6.2 Histologia	57
6.2.1 Achados histológicos da pele normal encontrados no biomodelo <i>Macaca mulatta</i>	57
6.2.2 Avaliação da viabilidade das amostras para inclusão no estudo histológico.....	65

6.2.3	Avaliação da relação entre o tempo de vida dos símios estudados, o escore corporal, eos parâmetros da espessura da epiderme e da camada córnea.....	67
6.2.4	Análise histopatológica semi-quantitativa.....	70
6.2.5	Análise Histomorfométrica.....	83
7.	DISCUSSÃO.....	96
7.2	Avaliação da viabilidade das amostras para inclusão no estudo.....	97
7.3	O impacto da congelação na preservação de amostras para estudo macro e microscópico da pele de <i>Macaca mulatta</i>	98
8.	CONCLUSÕES.....	104
9.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA DISSERTAÇÃO.....	105
	REFERÊNCIAS.....	106
	ANEXO A: DISPENSA CEUA.....	114

1. INTRODUÇÃO

A contribuição dos animais de laboratório às novas descobertas para a prevenção, tratamento de doenças e desenvolvimento de técnicas cirúrgicas tem um valor incalculável (ANDRADE, 2002). A demanda por primatas não humanos (PNH) como biomodelos na pesquisa científica ainda é real enquanto não houver uma completa substituição pelos diferentes métodos alternativos. Portanto, a atenção ao refinamento dos diferentes métodos empregados com os animais de laboratório, bem como à redução do número de animais nos experimentos constitui uma exigência constante para garantir o respeito ao Princípio dos 3Rs (RUSSELL; BURCH, 1959).

Fundamentando-se na premissa preconizada por Russel & Burch (1959), em pesquisas que envolvem animais, o ponto final humanitário é uma etapa comumente indispensável do processo científico. Recomenda-se que esta seja planejada de forma associada à uma ação posterior, de modo que possa permitir o aproveitamento máximo da carcaça, podendo, inclusive, ser utilizada em outras investigações (*Interagency Primate Steering Committee* (IPSC, 1980). A execução do exame macroscópico na necropsia e o exame histopatológico dos tecidos coletados, são de extrema importância para o monitoramento sanitário das colônias, fornecendo informações para ações de prevenção e controle contra patógenos específicos (SAISSE *et al.*, 2010).

Diversas alterações histológicas ocorrem após o óbito do animal. No que se refere ao tecido tegumentar as principais alterações macroscópicas são: o *algor mortis*, o *livor mortis*, o *origor mortis*, o dessecamento tegumentar e a pseudomelanose (DIMAIO; DIMAIO, 2001). Com relação às principais alterações microscópicas que ocorrem no tecido podemos citar: a perda progressiva da camada celular granulosa, com posterior degeneração hidrópica da camada espinhosa e perda da morfologia da camada basal na epiderme. Na derme, ocorre progressiva perda da estrutura de fibras colágenas até seu colapso e rompimento e degeneração progressivos apêndices cutâneos. Na hipoderme observa-se degeneração progressiva do tecido subcutâneo com perda da estrutura lobular e autólise de adipócitos (KOVARIK, 2005; BARBALE *et al.*, 2012; DENIS-RODRIGUEZ *et al.*, 2016).

Com o intuito de evitar tais alterações e possibilitar a análise macro e microscópica da espécie, é recomendado que a realização da necropsia ocorra imediatamente após o óbito. Diante da impossibilidade da imediata execução do exame, a carcaça deve ser refrigerada por até 48 horas após a morte. O congelamento pode ser praticado, mas esse procedimento não é

o recomendado para a submissão do espécime ao exame microscópico devido a formação de cristais de gelo intracelular, sendo utilizado como último recurso (SAISSE et al, 2010).

Dentro desta proposta, os estudos morfológicos e anatomopatológicos de espécies criadas em cativeiro são de fundamental importância, visto ser de fácil execução e baixo custo, oferecendo resultados importantes tanto a nível biológico quanto nosológico. Deste modo, esta dissertação foi estruturada, visando não apenas um maior conhecimento sobre a espécie a ser aplicado em diferentes áreas, como também a implementação de um processo de melhor aproveitamento da carcaça em respeito aos 3Rs.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O uso de primatas não humanos em ciência

Desde os primórdios, nota-se a participação de PNH em diversas áreas do desenvolvimento do conhecimento humano. Dados mostram que estes animais já haviam sido utilizados como fonte de estudos anatômicos e fisiológicos por diversos estudiosos da antiguidade, entre eles: Galeno, Aristóteles e Vesalius (COHEN, 1984). Contudo, sua relevância dentro da pesquisa científica como modelo animal, bem como a sua criação em cativeiro é relativamente recente, fato evidenciado a partir da elucidação do descobrimento da vacina contra poliomielite no ano de 1950 (SALK *et al.*, 1953). As principais espécies de PNH aplicadas em pesquisa estão entre os membros das famílias e Cercopithecidae (símios do Velho Mundo) (TARDIF *et al.*, 2006), sendo a espécie *Macaca mulatta* uma das mais utilizadas.

O uso da espécie se justifica devido à elevada similaridade com os humanos, no que diz respeito às suas características comportamentais (CAPITANIO, 1999), cognitivas (KÖHLER, 1925), fisiológicas (FINCH; AUSTAD, 2012), filogenéticas (MUBIRU, 2008) e neurais (VENTURA-ANTUNES; MOTA, 2013), que fizeram desse animal um dos modelos excepcionais para estudo nas mais diversas patologias que afetam os seres humanos.

2.2 Classificação taxonômica

De acordo com a taxonomia atual regulada pela *International Commission on Zoological Nomenclature* (GROVES, 2017), os PNH fazem parte da Ordem Primates e estão classificados em duas subordens principais: Strepsirrhini e Haplorrhini, de acordo com a estrutura do nariz. Nos estrepsirrhinos, o nariz encontra-se ligado ao lábio superior e fundido a gengiva, enquanto os haplorrhinos possuem uma membrana ao redor das narinas, o que permite uma maior gama de expressões faciais (ANDRADE, 2010).

Os integrantes da subordem Strepsirrhini encontram-se nas regiões de Madagascar, nas Ilhas de Comores, na África, Índia e no Sul da Ásia e são pertencentes às infraordens Lemuriformes ou Lorisiformes. Entre as suas principais características estão o formato do focinho mais proeminente, longas caudas e cérebros menores. A subordem Haplorrhini está subdividida em duas infraordens distintas: a Tarsiiformese a Simiformes (GROVES, 1017).

Esta última, por sua vez, segrega-se em duas Parvordens: a Platyrrhini (primatas do Novo Mundo) e a Catarrhini (primatas do Velho Mundo) (REIS; PERACCHI; ANDRADE, 2008).

Os Catarrinos habitam o continente africano, sudeste asiático continental e a Europa (Figua 1).

Figura 1: Distribuição geográfica da espécie *Macaca mulatta*.

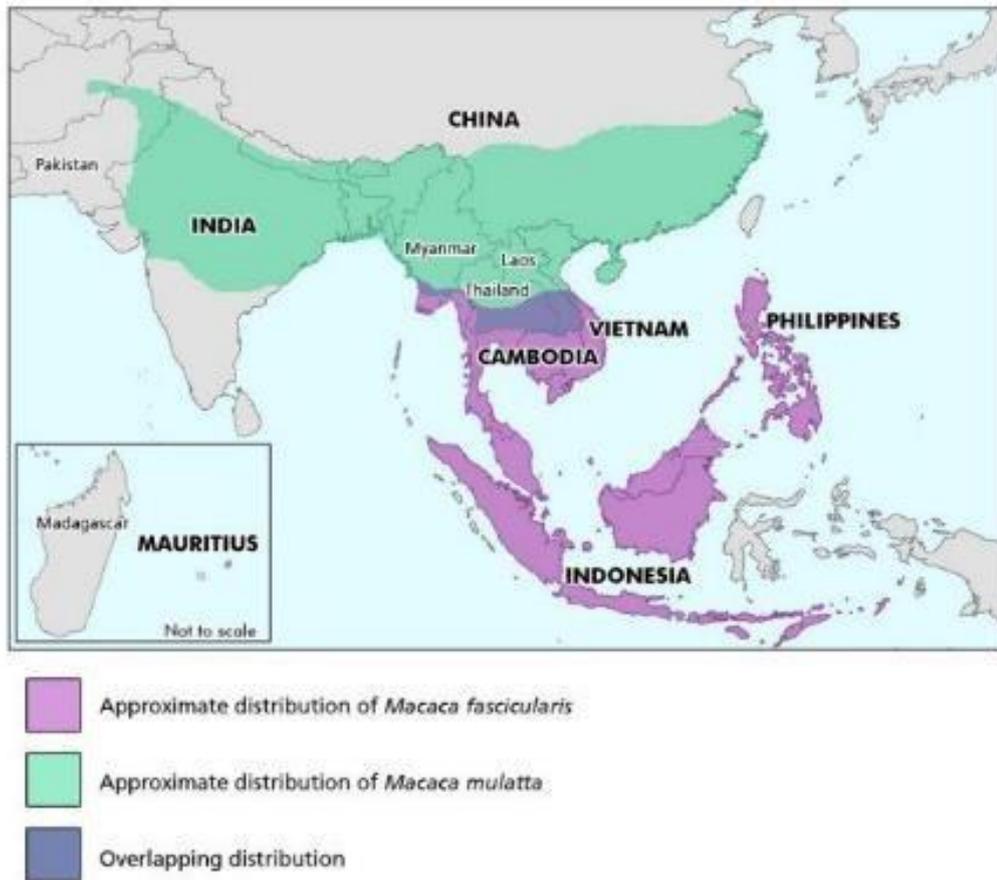


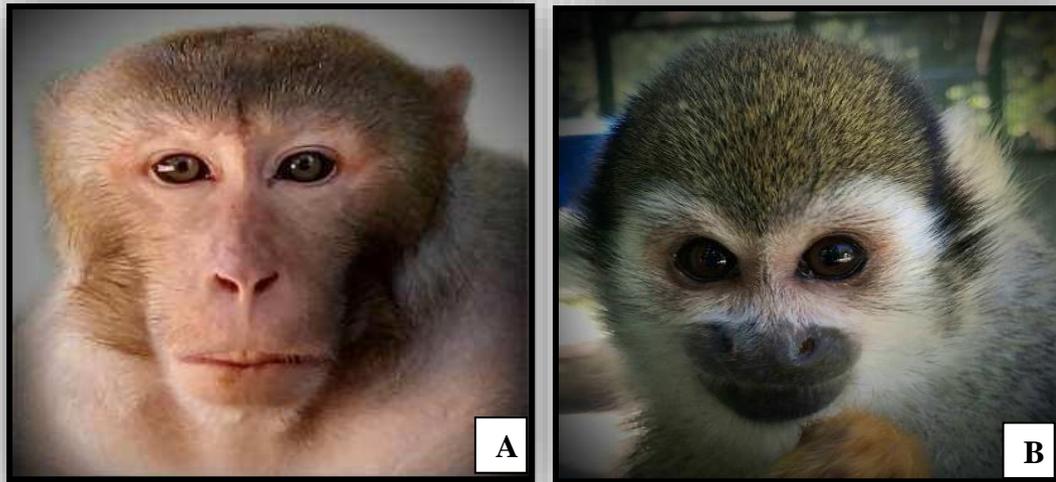
Ilustração do mapa com distribuição geográfica de *Macaca mulatta* e área de interseção com *M. fascicularis*. Fonte: Fooden (2000).

Apresentam dois pré-molares, septo nasal estreito e narinas voltadas para baixo (Figuras 2A e 2B), locomoção quadripedal, calosidade isquiática e a cauda, quando presente, não é preênsil. Ainda, podem ser divididos em duas Superfamílias: Cercopithecoidea e Hominoidea (PISSINATTI; GOLDSCHMIDT; SOUZA, 2010).

Os Platyrrinos estão distribuídos na região neotropical do planeta e se caracterizam por apresentarem narinas achatadas voltadas para o lado (Figura 2C) (REIS; PERACCHI; ANDRADE, 2008), podem possuir cauda preênsil, são de vida arbórea e, em sua maioria, possuem hábitos diurnos (AURICCHIO, 1995).

As principais espécies de PNH aplicadas em pesquisa estão entre as famílias Cercopithecidae e Cebidae, merecendo destaque, por frequência de utilização a espécie *Macaca mulatta*, na família Cercopithecidae e *Saimiri sciureus*, na família Cebidae (PISSINATTI; ANDRADE, 2010)

Figura 2: *Macaca mulatta* (A) e *Saimiri sciureus* (B), respectivamente.



Fotos evidenciando a projeção das narinas entre o grupo dos catarrinos com septo nasal estreito e narinas voltadas para baixo (A: *Macaca mulatta* e B: *Macaca fascicularis*) e platirrinos com narinas achatadas voltadas para os lados (C: *Saimiri sciureus*).

Fonte: Arquivo SCPrim, ICTB/Fiocruz.

2.2.1 *Macaca mulatta* (macaco rhesus)

A espécie *Macaca mulatta* (Figuras 2A e 3) está distribuída originalmente entre as regiões da China e da Índia (Figura 1), podendo ser encontrada também nas regiões de Butão, Laos, Birmânia, Nepal, Bangladesh, Tailândia, Vietnã, Paquistão e Afeganistão. São pertencentes à Parvordem Catarrhini e à subfamília Cercopithecinae (Quadro 1).

Quadro 1: Distribuição taxonômica da espécie *Macaca mulatta* (macaco rhesus).

HIERARQUIA TAXONÔMICA	
Reino	Animalia - Animal, animaux, animais
Sub-reino	Bilateria
Infra-reino	Deuterostomia
Filo	Chordata - cordés, cordado, cordados
Subfilo	Vertebrata - vertebrado, vertébrés, vertebrados
Infrafilo	Gnathostomata
Superclasse	Tetrapoda
Classe	Mammalia Linnaeus, 1758 - mammifères, mamífero, mamíferos
Subclasse	Theria Parker e Haswell, 1897
Infra-classe	Eutheria Gill, 1872
Ordem	Primatas Linnaeus, 1758 - homem, macaco, primata, sagui, primatas, primatas
Subordem	Haplorrhini Pocock, 1918
Infraordem	Simiiformes Haeckel, 1866
Superfamília	Cercopithecoidea Gray, 1821
Família	Cercopithecidae Gray, 1821 - macacos do Velho Mundo
Subfamília	Cercopithecinae Gray, 1821 - cercopithecines
Tribo	Papionini - papioninas
Gênero	Macaca Lacépède, 1799 - macacos
Espécies	<i>Macaca mulatta</i> (Zimmermann, 1780) - Macaco Rhesus, Macaca Rhesus

Fonte: Sistema Integrado de Informações taxonômicas (2000).

A espécie apresenta seis subespécies, sendo elas a *M. m. vestita*, *M. m. lasiota*, *M. m. sanctijohannis* e *M. m. brevicaudatus*, de origem chinesa e as subespécies *M.m. mulatta* e *M. m. villosa*, de origem indiana (SMITH; MCDONOUGH, 2005; CAWTHON, 2005). Morfologicamente, seus indivíduos apresentam pelagem de cor marrom a castanho-avermelhado, com pouco ou ausência de pelo na região facial e cauda com comprimento média média corporal em animais adultos entre 5000 – 5600 Kg em fêmeas e 5700 – 16800 Kg em machos (Figura 3) (FOODEN, 2000; ANDRADE, *et al.*, 2004).

Figura 3: Macaco rhesus (*Macaca mulatta*) macho (A) e fêmea (B) com seu filhote.



Fonte: Arquivo SCPrim, ICTB/Fiocruz

Apresentam ainda dimorfismo sexual (FOODEN, 2000; SINGH; SINHA, 2004), são quadrúpedes, e podem ser tanto arbóreos como terrestres (SETH; CHOPRA; SETH, 2001). Sua dieta é rica, compreendendo uma variedade de vegetais e invertebrados (RICHARD; GOLDSTEIN; DEWAR, 1989).

2.3 Princípio dos 3 Rs na pesquisa científica com PNH

A atenção ao uso de animais de laboratório é um fator de relevância para o desenvolvimento da pesquisa científica de forma ética e confiável (RIVERA, 2002). Devido à necessidade de se estabelecer parâmetros para o maior e melhor controle sobre o bem-estar dos biomodelos amplamente utilizados na pesquisa, em 1959, os pesquisadores Russell & Burch postularam o Princípio dos 3Rs (replacement, reduction, refinement), procurando minimizar o sofrimento animal e abrir caminhos para a busca por métodos alternativos em substituição aos modelos animais empregados em pesquisa (RIVERA, 2002). Este princípio é amplamente propagado e utilizado como referência pelas comissões de ética sobre uso de animais de laboratório em todo o mundo, definindo-se como: *Replacement* (substituição) – sempre que for possível, seja realizada a substituição ao uso direto de animais de laboratórios por outros métodos denominados substitutivos (ex: cultivo celular, métodos computacionais, manequins, etc.) ou, caso haja a impossibilidade de substituição total, que sejam utilizados animais que apresentem sistema nervoso menos desenvolvido; *Reduction* (redução) - quando o uso de animais se fizer necessário, deverá haver uso do menor número possível de animais, desde que se leve em consideração uma amostragem estatística significativa; e *Refinement* (refinamento) – promoção de técnicas menos invasivas e a preservação do estado de bem-estar animal (físico e emocional), minimizando eventos dolorosos, levando-se em consideração a senciência dos animais.

Desta forma, a importância da aplicabilidade dos 3Rs em ciência extrapola para além de promover o próprio bem-estar dos animais, contribuindo com a representatividade e reprodutibilidade dos resultados esperados, pois é de amplo conhecimento que o estresse (especialmente o distresse) influencia no estado fisiológico do animal, podendo ocasionar vieses nos experimentos. Dentro da gama de parâmetros que, quando alterados, são indutores de distresse, estão os próprios procedimentos experimentais em si, assim como a ambientação externa (macroambiente) e interna (microambiente), luminosidade, umidade, ruídos etc. Logo, conhecer a taxonomia, anatomia, fisiologia e o comportamento animal são de grande importância para o desenvolvimento da pesquisa científica de forma ética com reprodução de dados confiáveis (BRASIL, 2016).

2.4 A importância do conhecimento morfológico na pesquisa científica do sistema tegumentar em PNH

Embora o conhecimento morfológico da espécie seja de grande importância para o desenvolvimento e aprimoramento científico, ainda há escassa literatura referente à histologia tegumentar de PNH em ciência. Na década de 70, o maior número de informações foi registrado referente ao sistema tegumentar de PNH, inclusive demonstrando que cada espécie possui um perfil cutâneo único. Este fato pode ser verificado devido à sua notável variação na distribuição de melanócitos (MACHIDA; PERKINS; HU, 1967) e ao arranjo do folículo piloso (PERKINS; SMITH; FORD, 1969). Ainda, de acordo com Samuelson (2007), a distribuição das células de *Langerhans* que compõem a derme, bem com a sua projeção na epiderme, são características que podem auxiliar na identificação e classificação da espécie estudada.

Dois artigos clássicos na área (PERKINS, 1975; GRANT; PHILIP; HOFF, 1975) reforçaram ainda mais o emprego das características da pele como uma ferramenta útil inclusive na taxonomia de primatas.

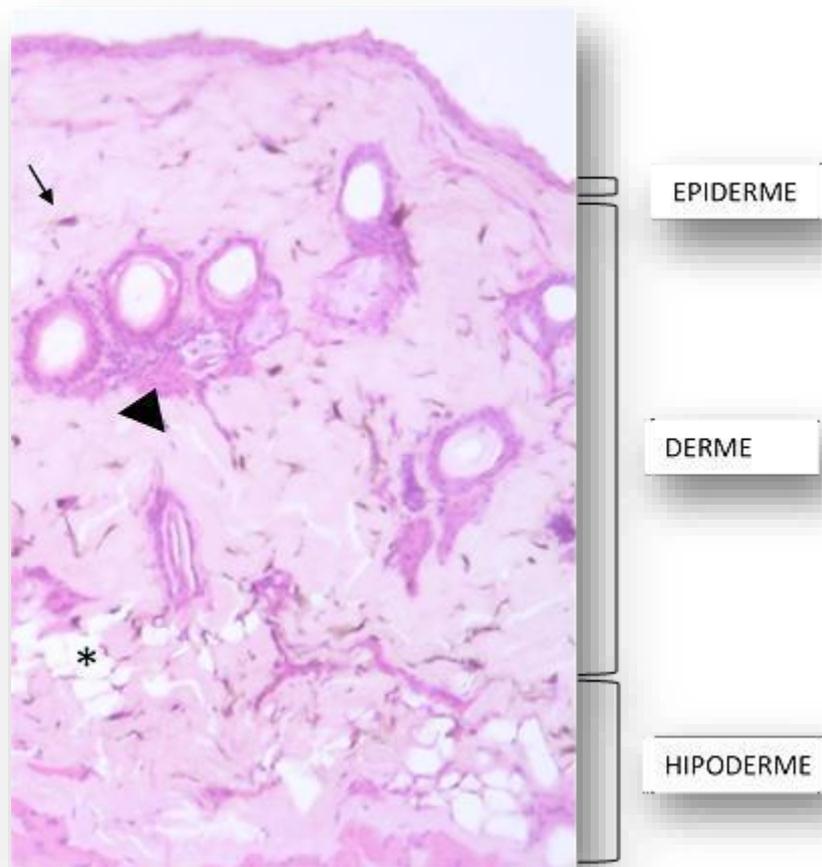
Segundo Oriá *et al.* (2003), a espessura da pele e a sua propriedade viscoelástica variam de acordo com a quantidade de material presente na camada derme da pele, bem como a sua organização estrutural. Assim, o envelhecimento também é um fator importante a ser considerado na avaliação da espessura cutânea, assim como o fato de independentemente da idade, a espessura total da pele, varia de acordo com a região do corpo (VITELLARO- ZUCCARELLO, 1994).

Em uma breve mineração de dados na plataforma PubMed (DEMARQUE *et al.*, 2019), foi possível constatar um amplo espectro de pesquisas relacionadas a algumas das principais espécies de PNH utilizadas em pesquisas aplicadas nos últimos 10 anos (5.604.841 artigos, cerca de 31% de toda a publicação desde 1969). Ainda, em relação apenas ao aspecto histológico do sistema tegumentar destas espécies (excluindo os dados para fins diagnósticos), foram encontrados 27 artigos para *Macaca mulatta* e somente dois para *Saimiri sciureus* em todo o período estudado. Por conseguinte, estes dados demonstraram a necessidade de ampliação e persistência no estudo e conhecimento morfológico destas espécies para evitar vieses em pesquisas e proporcionar resultados confiáveis.

2.5 O Sistema tegumentar de PNH

O tegumento constitui-se o maior órgão dos seres vivos, representando cerca de 16% de seu peso corporal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Dentre as funções desempenhadas pelo tegumento estão a proteção a agentes externos, a regulação da temperatura corporal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), a proteção contra os raios ultravioletas, a manutenção da hidratação do organismo, e atuar na percepção sensorial externa (OVALLE; NAHIRNEY, 2008). A pele (Figura 4) é constituída pela epiderme, composta por tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado, de espessura variável, e pela derme formada por tecido conjuntivo frouxo e densão modelado. Abaixo da derme encontra-se o tecido subcutâneo, formado por células adiposas e tecido conjuntivo frouxo (ROSS; PAWLINA, 2012). Como será discutido posteriormente, acredita-se que a disposição morfológica dos constituintes da pele pode auxiliar na identificação e classificação da espécie estudada (SAMUELSON, 2007) e, portanto, generalizações sobre os constituintes da pele de primatas devem ser realizados com muita cautela (MONTAGNA, 1972).

Figura 4: Pele fina da região ventral quadrante inferior esquerdo de macaco rhesus (*Macaca mulatta*).



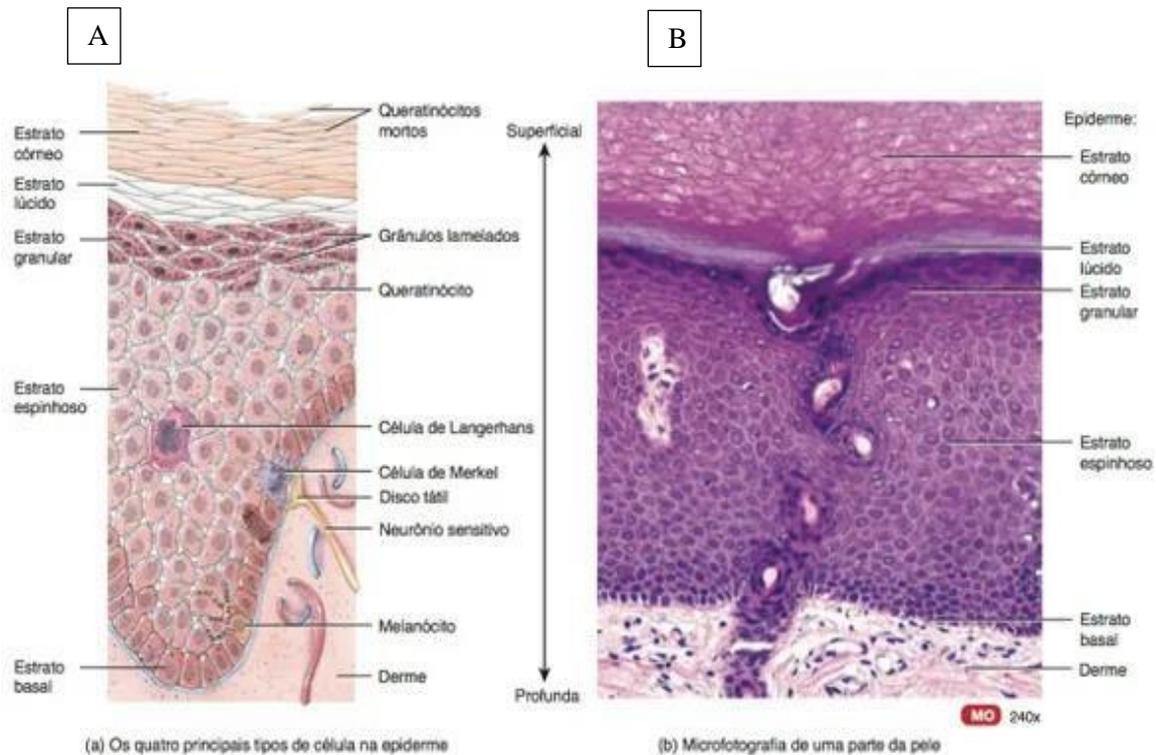
Fotomicrografia representativa evidenciando as camadas cutâneas e subcutâneas, anexos epidérmicos (cabeça de seta) e melanócitos intradérmicos (seta) e adipócitos do tecido subcutâneo (*). Coloração: Hematoxilina & Eosina. Objetiva 10x.

Fonte: Arquivo pessoal (2020).

2.5.1 Epiderme

A epiderme é a camada mais superficial da pele. De origem embrionária ectodérmica, é formada por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Em sua estrutura verifica-se a presença de cinco camadas celulares - queratinócitos – (Figura 5): I) a camada basal, formada por células colunares ou cubóides; II) a camada espinhosa, com células poliédricas a pavimentosas; III) a camada granulosa, composta apenas por células pavimentosas; IV) a camada lúcida, com células pavimentosas e anucleadas; e V) a camada córnea, composta por células pavimentosas anucleadas e queratinizadas (GARTNER; HIATT, 2007; SAMUELSON, 2007; KRAMER; BIELITZKI, 2012).

Figura 5: Esquema representativo (A) e Fotomicrografia (B) evidenciando os estratos basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo da epiderme.



Fonte: Tortora e Nielsen (2013).

Assim como em outros mamíferos, a epiderme em PNH se caracteriza por ser de espessura fina em regiões cobertas por pelos, enquanto em regiões onde há a ausência ou pouca pelagem (como a região da face), apresenta-se grossa. Nota-se ainda, presença de melanócitos epidérmicos e dérmicos bem distintos entre si (MONTAGNA, 1972). A camada basal, também denominada de camada germinativa, é responsável pela contínua renovação de queratinócitos, onde há a síntese de filamentos de citoqueratina (tonofilamentos) que, quando unidos aos hemidesmossomas dão suporte da base da epiderme à derme (HADLER; SILVEIRA, 1993; SAMUELSON, 2007). Ainda, nessa região, verifica-se a presença de melanócitos e células de Merkel (ROSS; PAWLINA, 2012). Os melanócitos produzem a melanina que dão tonalidade à pele, e que é sintetizada e direcionada para a região supracelular dos queratinócitos, fornecendo proteção ao material genético contra a radiação ultravioleta (GENESER, 2003). Sua síntese ocorre em estruturas intracelulares denominadas melanossomas, onde ocorre a conversão química do aminoácido tirosina em melanina (tirosina→dopa→dopaquinona→melanina) (ACKERMAN;BOER; GOTTLIEB, 2005). Já as células de Merkel são mecanorreceptores táteis encontrados em grande quantidade na pele grossa e na base dos folículos pilosos (LOWE;

ANDERSON, 2015). Apresentam pequenos grânulos citoplasmáticos elétron-densos e estão firmemente ancorados à membrana basal por meio de hemidesmossomos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A camada espinhosa possui enorme quantidade de filamentos de citoqueratina, agrupados em tonofibrilas que se projetam para o exterior da célula e se ligam aos desmossomos conferindo a esta camada aparência espinhosa, a atribuindo resistência ao atrito (HADLER; SILVEIRA, 1993; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Possui espessura variável e o formato de sua célula se modifica em direção à superfície (BACHA; BACHA, 2003), sendo geralmente pouco definida em muitas espécies de PNH (BIELITZKI, 2012). A camada basal em conjunto com a camada espinhosa frequentemente é referenciada como camada de *Malpighi* (KIERSZENBAUM *et al.*, 2004), onde é possível notar a presença de células de *Langerhans*. As células *Langerhans* são apresentadoras de antígeno e possuem prolongamentos distribuídos em diferentes direções (SAMUELSON, 2007). Essas células possuem a função de fagocitar e processar antígenos estranhos encontrados na pele, e apresentar os antígenos capturados aos linfócitos T, que iniciam a resposta imunológica. Ainda, estas células também participam das respostas alérgicas que ocorrem na pele (GARTNER; HIATT, 2007; GENESER, 2003). Tais células são encontradas em todos os PNH, apresentando apenas diferenças quando a sua forma e tamanho (MONTANGNA, 1972) e, acredita-se, que sua morfologia pode auxiliar na classificação e identificação entre as espécies animais (SAMUELSON, 2007).

A granulosa é formada por cerca de três a cinco camadas de queranócitos, que apresentam em seu citoplasma uma abundância de grânulos basófilos de queratohialina. Esses grânulos consistem em pró-filagrina, precursor da filagrina, proteína responsável pelo processo de queratinização e da permeabilidade da epiderme (EURLL; FRAPPIER, 2006). Nessa camada, verifica-se também a presença de terminações nervosas livres que atuam como receptores táteis da temperatura e dor (HAM; CORMACK, 1983).

Encontram-se ainda a presença de receptores encapsulados, situados tanto na derme como também na camada subcutânea da pele, entre eles os corpúsculos de *Ruffini*, *Vater-Pacini*, *Meissner* e *Krause*, que atuam como mecanorreceptores (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Estudos realizados na espécie *Macaca mulatta* evidenciaram que os corpúsculos de *Meissner* presentes na espécie são idênticos aos da espécie humana e são encontrados associados às papilas dérmicas com terminação na camada basal da epiderme. A disposição desses corpúsculos tende a influenciar a arquitetura dermatológica (RENEHAN; MUNGER, 1990).

A camada lúcida se limita a regiões de pele grossa, e é uma camada fina, translúcida e osinofílica com citoplasma repleto de filamentos de queratina envolto por material elétron-denso. As células dessa região são anucleadas, compactas e sem a presença de organelas citoplasmáticas. O citoplasma das células dessa região possui caráter espesso pela presença da proteína involucrina (GARTNER; HIATT, 2003; BACHA; BACHA, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A camada córnea apresenta células anucleadas, queratinizadas e pavimentosas. As células mais superficiais dessa camada não estão aderidas aos desmossomos, o que faz com que haja a contínua descamação dessa região. Ela forma uma camada impermeável à água, confere proteção ao atrito e contra invasão de microrganismos (OVALLE; NAHIRNEY, 2008; SAMUELSON, 2007).

Dentre as diversas variações interespecies que podem ocorrer na epiderme destaca-se, que em PNH, os melanócitos (sua presença e quantidade) apresentam-se como um elemento importante no estudo destes animais (MONTAGNA, 1972). Porém, são difíceis de ser quantificados, já que muitos animais possuem a pele rajada, não possuindo um padrão viável de ser analisado por área.

2.5.2 Derme

A derme é uma camada de origem mesenquimal, vascularizada e subdividida em derme papilar, região correspondente às papilas dérmicas, e derme reticular, região profunda da derme (GARTNER; HIATT, 2007). As papilas dérmicas são regiões em que há a projeção da derme na epiderme, fornecendo uma maior região de contato de forma a proporcionar maior resistência à pele, sendo mais proeminentes em regiões de pele grossa (MONTAGNA, 1962). A camada papilar é constituída por tecido conjuntivo frouxo, enquanto a derme reticular é constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, que apoia a epiderme e a une ao tecido subcutâneo, sendo este composto por adipócitos, tecido que contribui com a formação do contorno do corpo e tem estreita relação com a regulação da temperatura corporal, além de ser estoque de energia corporal (SAMUELSON, 2007). Ainda, é sugerido pela literatura especializada que a composição estrutural que forma o tecido cutâneo na região papilar apresenta variações entre as espécies símias (MONTAGNA, 1972), devendo ser cuidadosamente estudado de forma individualizada entre as diferentes espécies.

A derme possui diferentes tipos celulares, dentre eles os fibroblastos, macrófagos, mastócitos (células residentes da derme), melanócitos e leucócitos. A derme também é a região onde estão localizados os anexos da pele: os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas, além de vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas, podendo ser livres ou encapsuladas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). As terminações nervosas livres se localizam próximo aos folículos pilosos e atuam tanto como mecanorreceptores como nociceptores (HAM; CORMACK, 1983). Os corpúsculos de *Meissner*, os corpúsculos de *Pacini*, os corpúsculos de *Ruffini* e os bulbos terminais de *Krause* compõem as terminações nervosas encapsuladas (GARTNER; HIATT, 2007).

Estruturas importantes também presentes nesta camada são as fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares que atribuem à pele resistência e elasticidade (HAM; CORMACK, 1983; LOWE; ANDERSON, 2015). A camada dérmica tende a possuir uma estrutura grossada em regiões com maior ocorrência de efeitos abrasivos (SAMUELSON, 2007). Ela se encontra ancorada à membrana basal, estrutura responsável pela aderência da epiderme à derme, regula a proliferação celular e atua no metabolismo celular. São compostas por colágeno tipo IV, laminina, entactina e proteoglicanos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os símios possuem uma derme mais grossa e vascularizada que os prossímios e, em relação às fibras existentes na região, os diferentes símios possuem quantidades variáveis de fibras elásticas, porém em menor quantidade que a derme humana. As fibras elásticas estão presentes ao redor dos folículos pilosos, sustentando os músculos eretores do pelo e as glândulas sudoríparas. Ainda, pigmento dérmico de melanina pode ser encontrado na derme de símios (MONTAGNA, 1972).

2.5.3 Anexos

Estão situados nas regiões mais profundas da pele e sua quantidade varia de acordo com a sua localização (SAMUELSON, 2007).

Os pelos são estruturas vastamente queratinizadas, em forma de haste que crescem ancorados à invaginação da epiderme, o folículo piloso. Sua disposição e cor varia consideravelmente entre as diferentes espécies de PNH (MONTAGNA, 1962), e é circundado pela bainha do tecido conjuntivo fibroso e pela membrana vítrea, correspondente à membrana basal. Possui uma bainha radicular interna e externa derivadas da epiderme. Na porção terminal do pelo é encontrada a raiz associada às papilas dérmicas, formando o bulbo piloso. As células centrais formam a medula do pelo e ao redor destas células há a presença de células com maior

quantidade de queratina, o córtex do pelo, enquanto nas regiões mais externas formam-se a cutícula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; LOWE; ANDERSON, 2015).

Encontram-se ainda, os músculos eretores do pelo que estão dispostos obliquamente à bainha do tecido conjuntivo e à camada papilar da derme. Quando o músculo contrai, ocorre a elevação do pelo, permitindo o movimento de ar e liberando maior quantidade de calor. Adicionalmente, isola o corpo para reduzir a troca de calor com o ambiente, por meio da retenção de ar devido a sua movimentação (YOUNG, 1775b). Quando associado à cobertura sebosa, forma-se uma camada de resistência à água, contribuindo para o isolamento térmico do corpo a baixas temperaturas e, deste modo, fornecendo proteção física (SAMUELSON, 2007). Os pelos funcionam como importante barreira anatômica e fisiológica contra possíveis doenças que comprometem o bem-estar de PNH criados em cativeiros, o que pode comprometer a qualidade da pesquisa científica. O comprometimento da pelagem pode ocasionar a diminuição das camadas celulares da epiderme (STEINMETZ; KAUMANS; DIX, 2006).

Destaca-se que os PNH possuem vibrissas mais longas e melhor desenvolvidas nas espécies noturnas do que nas diurnas (VAN HORN, 1970 apud MONTAGNA, 1972). Em macacos rhesus, por exemplo, o bulbo capilar possui melanócitos que produzem melanina marrom, laranja ou amarelo pálido (MONTAGNA, 1972). Ainda, a coloração, disposição de pelagem e os ciclos de crescimento capilar são peculiares a cada espécie. Apesar de alguns folículos apresentarem uma rede nervosa bem elaborada em humanos, na maioria dos PNH não apresentam esta característica, sendo mais comum nas vibrissas e nos folículos dos discos faciais e da área anogenital.

A glândula sebácea é uma glândula alveolar ramificada simples que secreta o sebo, uma mistura complexa de lipídios e fragmentos celulares. Possuem células pequenas, de formato cúbico a pavimentoso. A secreção das glândulas sebáceas é do tipo holócrina. Estas glândulas estão associadas aos folículos pilosos, onde despejam o seu conteúdo nos ductos dos folículos pilosos, formando o canal pilossebáceo (SAMUELSON, 2007). São abundantes em regiões pilosas e ausentes em locais de pele grossa. Possuem ducto diminuto formado por epitélio estratificado pavimentoso ligado os folículos pilosos. Nas áreas do corpo onde há ausência de pelos, as glândulas sebáceas se desembocam diretamente na superfície da epiderme (STRAUSS; MATOLTSY, 1981). A principal função das glândulas sebáceas é proporcionar a lubrificação e proteção da pele e do pelo (LOWE; ANDERSON, 2015) e em PNH, possivelmente uma fonte de ferormônio (MONTAGNA, 1972).

Estas glândulas são raras na maioria das espécies de PNH, com exceção dos lêmures, que apresentam abundância de glândulas sebáceas semelhante à espécie humana. Na grande

maioria das espécies de PNH, estas glândulas se concentram nas regiões faciais e anogenitais. Em PNH a maioria das glândulas sebáceas possui melanócitos melanóticos gigantes em sua periferia e outras com apenas alguns grânulos de pigmento (MONTAGNA, 1972).

As glândulas sudoríparas possuem uma unidade secretora (adenômero) tubulosa simplesenovelada ligada à pele por toda a extensão do corpo e são abundantes nas regiões palmar e plantar. As glândulas sudoríparas mais comuns produzem secreção clara, aquosa e que contém sais, principalmente de cátions de sódio e potássio. Elas se encontram na região profunda da derme e sua secreção é eliminada no ducto da glândula localizado na superfície da epiderme. A glândula é cercada por tecido conjuntivo frouxo, onde há abundância de irrigação sanguínea. A principal função da produção de suor é o resfriamento do corpo quando este é aquecido; porém, nas espécies de PNH esta função está relacionada apenas às glândulas palmares e plantares. Já as de secreção merócrina são predominantemente encontradas em PNH e há variações em sua morfologia de acordo com a espécie analisada, bem como a atividade normal das glândulas sudoríparas localizadas na maior parte do tegumento é variável entre as espécies (SAMUELSON, 2007; GARTNER; HIATT; MONTAGNA, 1972).

2.5.4 Particulares cutâneas em PNH

Na pele de algumas espécies de PNH é possível notar a presença de “sex skin” (Figura 6), coloração avermelhada na pele, nas regiões do períneo e ao redor da cauda das fêmeas, bem como na região posterior das coxas e se relaciona visivelmente ao período de função ovariana (MONTAGNA, 1972).

Figura 6: Sex skin em *Macaca mulatta*.



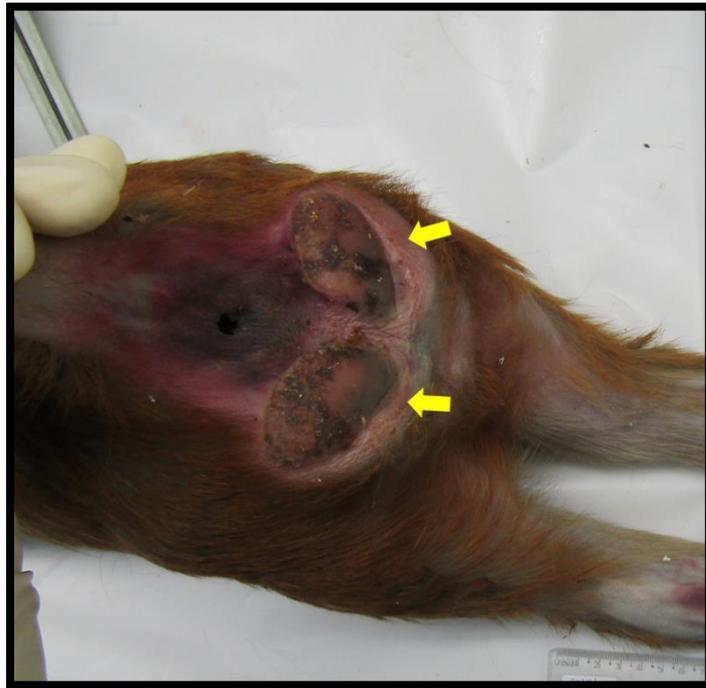
Base da cauda e região glútea apresentam intumescimento (setas) e intensificação da coloração da pele. A região perineal e djaçências demonstram pele em um tom vermelho intenso.

Fonte: Arquivo SCprim SCPrim/ICTB/Fiocruz

Na ovulação, a derme nesta região é esponjosa devido à grande quantidade de seios venosos que, durante a ovulação, se tornam ingurgitados e com acúmulo intrafibroso de polissacarídeos (BENTLEY, 1970 apud MONTAGNA, 1972). Este tipo de arranjo de seios venosos também pode ocorrer na face de macacos rhesus, principalmente nas fêmeas (MONTAGNA *et al.*, 1966 apud MONTAGNA, 1972).

Em símios mais velhos podem ser encontrados angiomas benignos distribuídos pelo corpo (LOWENSTINE, 2003). Macacos do Velho Mundo apresentam duras calosidades isquiáticas (Figura 7) (MONTAGNA, 1972).

Figura 7: Calos isquiáticos em *Macaca mulatta*.



Calos isquiáticos em carcaça de *Macaca mulatta* apontados pelas setas.

Fonte: arquivo SCPrim/ICTB/Fiocruz.

Entre as suas funções descritas em literatura, afirma-se que os calos isquiáticos permitem que estes animais consigam adormecer por algum tempo sentados e, vale ressaltar que embora muitas espécies de animais tenham a capacidade de se sentarem, somente o gênero *Macaca* e os grandes símios (bonobos, gorilas orientais e ocidentais, chimpanzés e orangotangos) possuem anatomia especializada para essa função (WASHBURN, 1957). Deste modo, estas são particularidades que devem ser de conhecimento do analisador para evitar vieses em estudos e diagnósticos.

2.6 O calendário tanatológico e o sistema tegumentar

Os exames anatomopatológicos são de grande importância para o reconhecimento histológico das estruturas que compõem os diferentes sistemas orgânicos e têm por objetivo realizar o diagnóstico das alterações morfológicas tanto macro quanto microscópicas dos tecidos e células animais por meio de biópsia ou por meio da coleta *post mortem* (SAISSE *et al.*, 2010; LOWENSTINE, 2003). Contudo, é preciso considerar que em caso de coleta *post*

mortem, podem ocorrer alterações no espécime analisado devido ao processo de autólise, podendo o dano tecidual ser de maior ou menor grau (FIEGUTH *et al.*, 1997). Tais alterações já foram amplamente descritas dentro da espécie humana com o intuito de elucidar a causa *mortis* e estimar o tempo de morte, principalmente dentro de investigações forense, sendo estas estimativas de importância tanto dentro da espécie humana quanto em animais (BROOKS, 2016).

As alterações cadavéricas são classificadas em abióticas imediatas (morte somática) e tardias (autólise), e bióticas ou transformativas (onde há o início do processo de putrefação). O conhecimento preciso de cada etapa tem contribuído de forma significativa na determinação do intervalo *post mortem*, dentre elas o *livor mortis*, *rigor mortis*, *algor mortis*, grau de putrefação, alterações químicas no vítreo, assim como a avaliação tecidual por citometria de fluxo e a avaliação do conteúdo estomacal e da atividade de insetos (DIMAIO; DIMAIO, 2001).

2.6.1 Alterações macroscópicas do sistema tegumentar

Sobre as alterações macroscópicas que acometem a pele, destacam-se o *algor mortis*, o *livor mortis*, o *rigor mortis*, o dessecamento tegumentar e a pseudomelanose.

2.6.1.1 *Algor mortis*

De acordo com a 2ª lei da termodinâmica, os corpos tendem a entrar em equilíbrio termostático com o ambiente que o cerca e não seria diferente no caso da perda de vitalidade de um corpo. Quando um organismo perde a sua capacidade de termorregulação, como no caso de morte, ocorre a perda gradativa de cerca de 1°C por hora, podendo essa estimativa variar entre as espécies, até atingir o equilíbrio com o ambiente que o cerca (SWIFT, 2006). Para estimar o intervalo da morte tendo como base friidez cadavérica, é preconizada a sua contagem a partir de três horas após a morte (BROOKS, 2016). No entanto, diversos parâmetros podem influenciar nessa estimativa. O esfriamento ocorre sempre das extremidades para o centro e, quanto maior o pânículo adiposo, maior a dificuldade de resfriamento do cadáver. Ademais, pacientes que apresentavam enfermidades crônicas ou hemorragias severas podem apresentar grau mais rápido de resfriamento em contraste com aqueles que antes da morte apresentaram insolação, internação, intoxicação por venenos, além de doenças infecciosas agudas e o tamanho corporal que ocasionam resfriamento mais lento do cadáver (FRANÇA, 2001; BROOKS, 2016).

2.6.1.2 *Livor mortis*

O *livor mortis*, é também chamado de manchas de posição, manchas de hipóstase, ou *livor* cadavérico e ocorrem em todos os cadáveres, com exceção apenas dos que padeceram de intenso processo hemorrágico (FRANÇA, 2001). Nessa etapa ocorre a coloração roxo-avermelhada do tegumento em razão do acúmulo sanguíneo em pequenos vasos sob a força da gravidade (DIMAIO; DIMAIO, 2001), variando, portanto, com a região do corpo, e se apresentando sob a forma de placas ou, em casos mais raros, de pontilhados denominados de púrpuras hipostáticas. O tempo de aparecimento se inicia em cerca de 30 minutos a 2 horas em humanos segundo Brooks (2016), e de 2 a 3 horas segundo França (2001). Consiste em uma alteração importante tanto para o diagnóstico de causa *mortis* como para a estimativa do tempo de morte e para avaliação da posição do cadáver após a morte (FRANÇA, 2001). Neste processo, regiões do corpo que entram em contato direto com a superfície adquirem coloração arroxeada, enquanto as regiões mais elevadas tendem a sofrer uma descoloração denominada lividez cadavérica (KNIGHT, 1996).

É importante destacar que, após um período entre 8 a 12 horas há o extravasamento do sangue para os tecidos próximos em resposta à degradação dos vasos por hemólise, resultando em *livor mortis* fixo (BROOKS, 2016). Essa alteração dificulta a sua interpretação em relação a patologias com extravasamento tecidual de sangue. Apesar de tal processo ser notório dentro da espécie humana, não há ampla evidência em animais (ERLANDSSON; MUNRO, 2007).

2.6.1.3 *Rigor mortis*

O *rigor mortis*, também conhecido com rigidez cadavérica, é caracterizado pelo enrijecimento da musculatura corporal ocasionado pela falta de trifosfato de adenosina (ATP), base da energia muscular. Logo após a morte a geração de ATP cessa, ocasionando o estado de contração muscular permanente das fibras de actina e miosina, até que por meio do processo de putrefação das fibras o complexo actina e miosina seja desfeito. O *rigor mortis* tem início cerca de 2 a 4 horas após a morte e atinge seu clímax entre 6 a 12 horas. Fatores como doenças e o tipo de clima na ocasião da morte podem antecipar o desenvolvimento da rigidez cadavérica (DIMAIO; DIMAIO, 2001).

2.6.1.4 Dessecamento tegumentar

O dessecamento tegumentar ocorre logo ao final da rigidez cadavérica onde há o relaxamento da musculatura e posterior flacidez tecidual. Este fenômeno resulta na diminuição do peso corporal ocasionado pela perda de líquido e posterior enrijecimento da pele e diminuição do globo ocular (BROOKS, 2016).

2.6.1.5 Pseudomelanose

Com o início do processo de putrefação, etapa onde há grande proliferação bacteriana, surge a pseudomelanose. Nessa fase, ocorre a interação do ácido sulfídrico produzido por bactérias e a hemoglobina, gerando sulfametamoglobina, resultando em uma coloração cinza-esverdeada na pele da região abdominal, mais proeminente na região inguinal direita (pela presença do ceco e sua proximidade à parede abdominal). Seu aparecimento ocorre em média 20 a 24 horas após a morte (FRANÇA, 2001). Além disso, ocorre o surgimento de enfisema tecidual, presença de bolhas de ar por toda a extensão da pele devido à alta produção de ácido sulfídrico por bactérias, bem como na musculatura e em órgãos internos. Outros processos podem ainda ocorrer mais tardiamente de acordo com o tempo (coliquação e esqueletização) ou ambiente em que é exposto ao cadáver (mumificação, saponificação, calcificação, corificação e congelamento) (BANDARRA; SEQUEIRA, 1999).

2.6.2 Alterações microscópicas tegumentares no *post mortem*

Ainda hoje há poucos trabalhos sobre as alterações cutâneas oriundas do período *post mortem* e que demonstrem a sua progressão. Em um destes estudos, realizado por Kovarik *et al.* (2005), foram observadas alterações destrutivas dérmicas caracterizadas por uma diminuição da espessura da derme com uma discreta saliência das fibras elásticas.

Já em 2012, de acordo com Bardale e colaboradores, nas primeiras 6 horas após a morte não é possível constatar mudanças morfológicas significativas na epiderme e na derme. Após esse período, é possível notar o surgimento de vacúolos nas camadas espinhosas e basal da epiderme e posterior desprendimento. Com o avanço do intervalo *post mortem*, em aproximadamente 12 a 18 horas, há a separação estrutural da epiderme e da derme e, entre 6 a 9 horas há a degeneração focal visível na derme. Após ultrapassar as 18 horas ocorre a desintegração da derme.

Denis-Rodríguez *et al.* (2016) acompanharam diversos parâmetros histológicos em 23 biópsias cutâneas durante um intervalo de 6 até 78 horas em temperatura de 26°C e 70% de umidade. Foram observadas: i) alterações quanto à presença das camadas córnea e granulosa; ii) topografia de degeneração hidrópica na camada espinhosa; iii) alteração na orientação das fibras de colágenas e no percentual de degeneração hidrópica de células espinhosas; iv) perda da morfologia da camada basal; v) degeneração de melanócitos; vi) hialinização das fibras colágenas; vii) degeneração hidrópica de glândulas sudoríparas; viii) descolamento e necrose de glândulas sebáceas; ix) necrose de folículos pilosos; x) perda da morfologia dos adipócitos e na conservação da estrutura lobular hipodérmica.

Por conseguinte, a partir dos estudos encontrados, pode-se atribuir a seguinte progressão dos eventos microscópicos tegumentares após o óbito: sem alterações até as 6 primeiras horas, seguido de perda progressiva da camada córnea e granulosa, com posterior degeneração hidrópica da camada espinhosa e perda da morfologia da camada basal na epiderme. Na derme, ocorre progressiva perda da estrutura de fibras colágenas até seu colapso e rompimento e degeneração progressiva dos apêndices cutâneos. No tecido subcutâneo, observa-se degeneração progressiva do tecido subcutâneo com perda da estrutura lobular e autólise de adipócitos (KOVARIK, 2005; BARBALE *et al.*, 2012; DENIS-RODRIGUEZ *et al.*, 2016).

2.6.3 Fatores que influenciam no processo de decomposição

Apesar de serem conhecidos os principais eventos tanatológicos, o processo de decomposição pode ser influenciado por diversos fatores, incluindo o quantitativo de células adiposas presentes no organismo, patologias presentes, e em casos de humanos, o tipo de roupa, pois tendem a manter o corpo quente e aceleram este processo (DIMAIO; DIMAIO, 2001).

Fatores como a temperatura ambiental e corporal, causa da morte e a microbiota presente também influenciam na estimativa do intervalo *post mortem* (IPM), onde temperaturas ambientais elevadas aceleram o processo de autólise, assim como a elevada temperatura corporal *ante mortem*, seja por causa febril, alta taxa metabólica ou calor excessivo. Além disso, animais obesos tendem a apresentar um retardo no resfriamento corporal, fato que ocasiona uma aceleração do processo de decomposição do organismo (ZACHARY; GAVIN, 2013). Não obstante, climas quentes e secos tendem a acarretar uma rápida desidratação podendo levar a um processo de mumificação (LEW; MATSHES, 2005). Em climas tropicais, como o Brasil, onde a taxa de umidade e temperatura são elevadas há uma tendência de Obj significativo dos fenômenos autolíticos e putrefativos, resultando na aceleração dos processos

destrutivos da morfologia cadavérica (LUCIO, 2013).

A presença de insetos no cadáver também pode colaborar com a determinação do tempo de morte e influenciar no grau de decomposição. Várias espécies são atraídas por meio do odor recorrente, dentre eles os necrófagos, espécies que se alimentam do próprio corpo, predadores e parasitas que se alimentam dos insetos necrófagos, e as espécies onívoras, que se alimentam tanto do corpo como também dos demais insetos; sendo as espécies necrófagas mais importantes para determinar o IPM (DIMAIO; DIMAIO, 2001).

Vale ressaltar que o tamanho corporal e a espécie em análise são um fator importante à ser considerado, pois a expressão das alterações cadavéricas se dá de forma peculiar entre as espécies. Com isso, o intervalo entre o início do processo de decomposição até o seu clímax pode variar de acordo com a proporção corpórea e a temperatura corporal em vida (BROOKS, 2016).

Em função dos diferentes fatores que podem influenciar acelerando o tempo para a decomposição, medidas devem ser implementadas de forma a minimizar os danos teciduais e permitir uma observação e diagnóstico fidedignos em caso de morte de animais, principalmente mediante a impossibilidade de realização da necropsia no momento logo após o óbito. Uma das formas mais utilizadas é o resfriamento da carcaça, com posterior descongelamento em momento oportuno para realização do procedimento de exame necroscópico. Entretanto, apesar de retardar o tempo de desenvolvimento dos processos decompositores, alguns fatores devem ser avaliados e levados em consideração para avaliar a viabilidade ou não de utilizar este procedimento em PNH.

2.7 O Impacto do tempo de congelação na morfologia do sistema tegumentar

Mansoor e colaboradores (2015) mostraram que o congelamento pode ocasionar danos estruturais ao tecido tegumentar, como o Obj da porosidade e alterações das propriedades mecânicas da pele, provavelmente devido à formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento. As observações dos referidos autores corroboram com as descobertas de Kasting e Bowman (1990), onde descreveram que a permeabilidade dos íons de sódio na pele humana fresca era significativamente menor do que na pele humana previamente congelada.

De acordo com Schiozer (2012), a pele após ser refrigerada perde gradualmente a viabilidade celular ocasionando a degeneração das características biológicas. Este processo de preservação da pele por congelamento pode ocasionar o Obj da porosidade e alterações da

propriedade mecânica da pele devido à formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento; quanto mais lentamente o processo de congelamento ocorre, maior será também a formação de cristais de gelo e a distorção do tecido (MEHREGAN; ALBERTA; PINKUS, 1966).

Para evitar a formação desse artefato, Saisse *et al.* (2010) sugeriram que o exame necroscópico seja realizado imediatamente após o óbito do animal, ou caso em situações em que não há a possibilidade de imediata realização do exame necroscópico que acarcaça seja armazenada e refrigerada por até 48h. Essa recomendação se aplica, pois em alguns casos o congelamento pode formar cristais de gelo que causam destruição da arquitetura celular, dificultando o exame microscópico. Considerando a impossibilidade da presença de um médico veterinário 24 horas nas instalações de criação, manutenção e experimentação de PNH para realização das necropsias, muitas das vezes o congelamento da carcaça é realizado com mais de 48 horas após a morte.

Portanto, o artefato de congelamento se manifesta em seções de tecido em vários graus de gravidade, variando de vacuolização mínima de células com perda parcial de capacidade de seus núcleos até a vacuolização severa com perda completa de estrutura celular. Entretanto, seções histológicas quando bem fixadas pela técnica de congelação demonstram raras evidências de congelamento quando descongeladas e submetidas à técnica de habitual histológica de rotina (MEHREGAN; ALBERTA; PINKUS, 1966).

Apesar de não ser um procedimento ideal, destaca-se que o congelamento de carcaças também pode influenciar reduzindo o padrão de decomposição, onde a taxa de putrefação e dessecação ocorre de forma mais lenta em comparação aos animais não congelados (BROOKS, 2016). Salienta-se que estudos relacionados à preservação da pele em humanos realizados a partir do século XX por Webster e sua equipe e, desde então, foi confirmado por inúmeros autores que a pele pode ser refrigerada por aproximadamente 15 a 30 dias, porém com perda gradual da viabilidade celular e degeneração das características biológicas (SCHIOZER, 2012). Neste aspecto, a cronologia destas alterações e o impacto deste procedimento em PNH ainda representam uma lacuna na área de pesquisa nas diferentes espécies símias.

3. JUSTIFICATIVA

Os exames anatomopatológicos são bastante utilizados no controle sanitário das colônias tanto na criação quanto na experimentação animal. Com o intuito de evitar vieses nos estudos e proporcionar resultados confiáveis, o conhecimento morfológico sobre as peculiaridades de cada espécie e seus respectivos sistemas se torna indispensável. Os PNH são biomodelos para diversas patologias cutâneas. Porém, apesar de na década de 70, o maior número de informações sobre a pele de PNH ter sido gerada, constatou-se que cada espécie possui um perfil cutâneo único e, como a necropsia e a histopatologia são técnicas utilizadas com frequência em PNH, algumas considerações devem ser ponderadas. No estudo histológico em biomodelos deve-se levar em conta que as alterações *post mortem* podem influenciar de forma decisiva em diferentes técnicas de diagnóstico, inclusive causando resultados falso-positivos, como no caso de algumas reações imuno-histoquímicas.

Pesquisas quantitativas em estudos tanatológicos apresentam grande variabilidade, fato que reforça ainda mais o papel da anatomia patológica no diagnóstico *post mortem*. Ademais, a fim de evitar vieses, a literatura recomenda que a necropsia deve ser realizada imediatamente após a morte do animal para minimizar os efeitos da autólise. No entanto, a literatura científica é limitada em estudos sobre a cronotanatognose e o impacto do processo de congelação no sistema tegumentar destes animais. Apesar de algumas alterações cutâneas já terem sido amplamente estudadas para o modelo humano, há uma lacuna na área de estudos em primatologia sobre as alterações macroscópicas e histológicas da pele, bem como de sua histologia normal de PNH. Dentro deste escopo, o conhecimento das características morfológicas cutâneas em PNH e de prováveis alterações *post mortem* observadas se torna importante para o diagnóstico diferencial de possíveis causas de lesão *ante mortem*, auxiliando no processo de diagnóstico necroscópico, inclusive na determinação do tempo de morte.

Este estudo pretende contribuir com informações acerca da histologia cutânea de PNH, assim como da viabilidade da técnica de congelamento para preservação da morfologia da pele para exames macroscópicos e histológicos. Os resultados irão contribuir para elaboração de um atlas de histologia da pele de PNH, auxiliando patologistas para o diagnóstico histopatológico mais acurado, contribuindo para um melhor monitoramento sanitário de colônias e na experimentação com PNH que envolva estudos macro e microscópicos histológicos e patológicos do sistema tegumentar.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Avaliar a estrutura macroscópica e histológica da pele de macaco rhesus (*Macaca mulata*), bem como o impacto do procedimento de congelamento de carcaças e de efeitos autolíticos na morfologia da pele da referida espécie símia.

4.2 Objetivos específicos

- Comparar os achados microscópicos do sistema tegumentar da espécie estudada em diferentes regiões anatômicas;
- Comparar os achados em microscopia de luz, histoquímica e histomorfometria dos constituintes teciduais de amostras congeladas diante das amostras frescas, não congeladas (controle);
- Disponibilizar informações científicas sobre a histologia tegumentar da espécie símia estudada, para composição de um atlas digital sobre PNH, servindo como material didático, sendo este o produto da dissertação.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Princípios éticos

Nenhum animal foi submetido à eutanásia para a realização do presente trabalho. Desta forma, o estudo tem a dispensa da licença da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), de acordo com a legislação do CONCEA (Lei 11784/2008 e Decreto 6899/2009) (ANEXO A).

5.2 Animais

Para o experimento, foram utilizadas 20 carcaças de macacos rhesus (*Macaca mulatta*), de ambos os sexos, de diferentes faixas etárias, provenientes do Serviço de Criação de Primatas não Humanos (SCPrim) do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ).

Os animais foram distribuídos entre três grupos experimentais: G1 (grupo controle), composto por seis animais; G2 (grupo experimental), formado por oito animais; e G3 (grupo experimental), por seis animais, conforme a descrição a seguir:

- G1 (grupo controle): Animais submetidos à eutanásia que se fez necessária devido a diferentes históricos clínicos e tiveram as suas amostras coletadas entre 15-30 minutos aproximadamente após o óbito. As amostras foram fixadas em formalina tamponada à 10%.
- G2 (grupo experimental): Animais que foram submetidos à eutanásia por causas distintas e que foram armazenados em temperatura de -20°C , com aproximadamente 15-30 minutos após o óbito para posterior coleta e fixação do material biológico.
- G3 (grupo experimental): Animais que foram encontrados mortos dentro do recinto entre 12 horas e 24 horas após o óbito e que foram congelados em temperatura à -20°C com posterior coleta e fixação do material.

Para a seleção dos espécimes, foi feita uma rigorosa avaliação macroscópica dos animais durante o procedimento de necropsia, incluindo apenas os animais que não apresentaram alterações patológicas cutâneas, e que poderiam ter impacto direto sobre a análise da pele. Foram excluídos os animais que apresentaram estados avançados de putrefação.

Quadro 2: Dados dos animais incluídos no estudo do biomodelo *Macaca mulatta*.

Grupo Experimental	Animal	Data da Coleta	Sexo	Idade	Escore corporal
G1	5	31/05/2019	M	20 anos	5
	11	30/08/2019	M	12 anos	3
	15	04/12/2019	M	8 anos	4
	19	12/11/2020	M	5 anos	2
	21	10/12/2020	M	6 anos	3
	22	28/09/2020	F	15 anos	4
G2	6	11/06/2019	F	12 anos	5
	12	11/09/2019	F	2 anos	4
	17	12/11/2020	M	10 anos	2
	18	12/11/2020	M	4 anos	2
	20	03/12/2020	M	20 anos	5
	23	12/05/2021	M	5 anos	3
	25	14/05/2021	M	5 anos	3
27	18/05/2021	M	14 anos	5	
G3	1	10/05/2019	M	4 anos	2
	3	15/05/2019	F	9 anos	4
	13	23/10/2019	M	4 anos	4
	14	28/11/2019	M	4 anos	3
	16	07/01/2020	M	4 anos	4
	26	21/05/2021	F	22 anos	4

G1 (grupo controle) - Animais submetidos à eutanásia com coleta imediata do material biológico; G2 (grupo experimental) – Animais submetidos à eutanásia, e imediatamente congelados a -20°C para posterior coleta do material; G3 (grupo experimental) – Animais encontrados mortos no recinto e congelados a -20°C para posterior coleta do material. M – Macho; F – Fêmea.

5.2 Coleta das amostras

Para coleta do material biológico os animais do grupo G1 tiveram suas amostras coletadas para análise com 15-30 minutos após o óbito. Os animais dos grupos G2 e G3 foram retirados do freezer entre 19 e 24 horas antes do procedimento, a fim de serem descongelados a temperatura ambiente para posterior coleta.

As carcaças foram dispostas paralelamente à mesa para exame necroscópico, onde foi realizado um minucioso exame macroscópico da pele para posteriormente prosseguir com a coleta. As áreas coletadas para análise foram: região parietal superior medial (PA), região cervical posterior (CE), região torácica intermamária (TORIM), região torácica interescapular (TORES), região ventral quadrante inferior esquerdo (VE) e região sacral (SA), totalizando seis amostras por animal. Todas as amostras foram retiradas de pele intacta, sem trauma ou lesão aparente. Ainda, foram coletadas amostras das regiões palmar (PL), plantar (PT) e calosidade isquiática (CI).

Para a coleta, foi feita prévia tricotomia das regiões, seguida da remoção de um fragmento de aproximadamente 6mm de diâmetro através de uma incisão percutânea até atingir a área da musculatura (Figura 8).

Figura 8: Coleta do material biológico para análise.

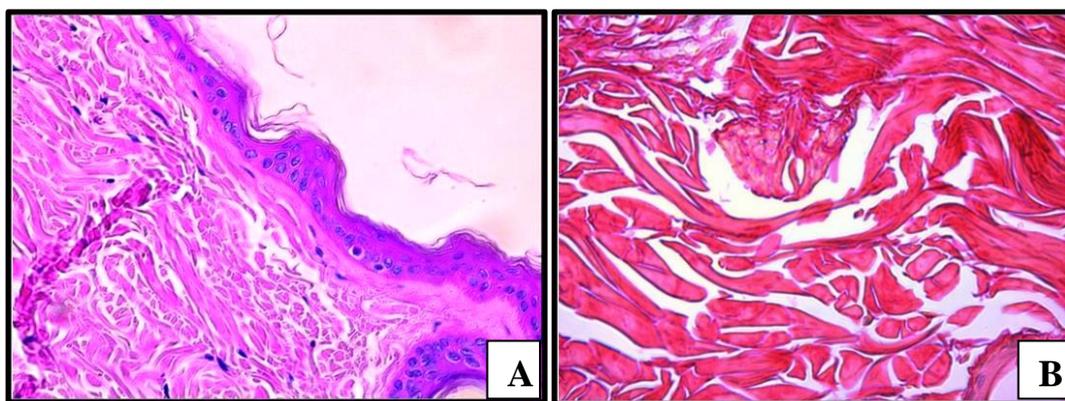


Fragmento de pele em macaco rhesus (*Macaca mulatta*), removido após tricotomia da região para posterior Colheita, utilizando um “punch” dermatológico de 6mm de diâmetro.

Fonte: Arquivo pessoal.

As amostras foram fixadas em formalina tamponada 10% em solução de tampão fosfato (PBS). Posteriormente, o material foi clivado no plano longitudinal de modo que os cortes pudessem elucidar todas as camadas presentes da pele e processadas pelas técnicas habituais para inclusão em parafina, seccionadas em 5 μ m de espessura em micrótomo e coradas pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (H&E) e Picrossírius Red (Figura 9). Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Histotécnica da Coordenação de Experimentação Animal (CPEA/ICTB/FIOCRUZ).

Figura 9: Fotomicrografia representativa das técnicas de coloração histológica H&E (A) e Picrossírius Red (B).



Legenda: H&E e Picrossírius Red. Obj 40x, pele, macaco rhesus.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3 Análise macroscópica do sistema tegumentar

As amostras foram avaliadas qualitativamente com relação à presença das alterações cadavéricas como dessecamento tegumentar, hipóstase cadavérica, estado de conservação geral da pele, presença de pseudomelanose e a variação do escore corporal entre os animais do estudo (Quadro 3).

Quadro 3: Parâmetros macroscópicos para avaliação do sistema tegumentar de PNH.

Item Analisado	Critério de Avaliação
Dessecamento tegumentar	Presente ou Ausente
Hipóstase cadavérica	Presente ou Ausente
Autólise	0% <10%. 10-50% >50%
Estado macroscópico geral da pele	Ótimo, Bom ou Regular
Presença de Pseudomelanose	Presente ou Ausente
Score corporal	Caquético, Magro, Normal, Sobre peso leve, Obeso

5.4 Viabilidade das amostras para inclusão dentro do estudo histológico

Com o intuito de verificar a viabilidade das amostras, foi feita uma triagem microscópica das lâminas coradas pelo método H&E através de microscopia óptica avaliado por médico veterinário experiente em histopatologia. As amostras que apresentaram alterações patológicas foram excluídas do estudo.

5.5 Histopatologia tegumentar

As lâminas histológicas foram avaliadas semi-qualitativamente quanto à integridade das camadas (epiderme/E, derme/D), tendo como base uma adaptação do critério de Denis-Rodriguez e colaboradores (2016) (Quadro 4) e avaliadas por um médico veterinário patologista da equipe.

Quadro 4: Parâmetros microscópicos para avaliação do sistema tegumentar de PNH.

Item analisado	Critério de classificação
Presença de camada córnea	presente ou ausente
Compactação da camada córnea	compacto ou solto
Percentual de destacamento da camada córnea	0%, <10%, 10-50%, > 50%
Condensação basofílica	0%, <10%, 10-50%, > 50%
Topografia da degeneração da camada espinhosa	ausente, metade superior, total
Percentual de degeneração hidrópica precoce da camada espinhosa	0%, <10%, 10-50%, > 50%
Percentual de perda da morfologia da camada celular basal	0%, <10%, 10-50%, > 50%

5.6 Morfometria da epiderme e camada córnea de *Macaca mulatta*

As imagens registradas para análises quantitativas foram capturadas por meio do programa Zen 2 (Carl Zeiss) através do microscópio Primo Star Zeiss[®] vinculado à uma microcâmara digital (AxionCam Erc.[®]). A espessura da epiderme (EP) e camada córnea (CO) foi determinada através da mensuração de sua espessura em 30 campos de Obj de 40X distintos da EPe da CO (Figura 10) para cada animal e posteriormente calculada a média e o desvio padrão. Para a análise, as lâminas foram confeccionadas em corte corados pela técnica de H&E e a mensura foi feita com o uso do software ImageJ.

Figura 10: Fotomicrografia representativa da mensuração da epiderme e da camada córnea.



Coloração por H&E. Obj de 40X, pele, *Macaca mulatta*.

Fonte: Arquivo pessoal.

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Histotécnica da CPEA (ICTB-Fiocruz).

5.7 Quantificação de fibra colágeno

Com o objetivo de quantificar o percentual total de fibras colágenas presente na camada dérmica da pele, foi feito o preparo de lâminas coradas pelo método Picrosírius Red, onde as imagens foram registradas através da microcâmera AxioCam Erc 5 acoplada ao microscópio Leica MC190 HD e associada ao programa LAS-V4-13 (Leica Application Suite). Para a realização da medição, foi feita a captura de imagens de 20 campos aleatórios em objetiva de Obj de 40X, e as análises foram realizadas por meio do software ImageJ e os valores obtidos foram comparados entre os diferentes grupos experimentais.

5.8 Fatores de interferência no processo de decomposição após a morte

Para verificar a interferência quanto à temperatura e umidade relativa sobre o grupo experimental G3, foi feita a coleta de dados climatológicos através do banco de dados do Sistema Alerta Rio da Prefeitura do Rio de Janeiro referente ao dia do óbito de cada animal pertencente ao grupo. Foi submetido à análise estatística de regressão simples para avaliação quanto a interferência quanto a integridade da estrutura tegumentar.

5.9 Elaboração do atlas digital de histologia de PNH

Conforme anteriormente descrito, as imagens captadas das camadas e anexos do sistema tegumentar (em resolução mínima de 2584 X 1936 pixels), foram utilizadas para exibição e inauguração virtual do “Atlas digital de histologia de biomodelos convencionais e não convencionais do Instituto de Ciência e Tecnologia de Biomodelos/Fiocruz”. O Atlas será vinculado ao projeto estratégico intitulado Anímenos - Plataforma de Compartilhamento de Material *in vivo* e Digital de Animais Experimentais do ICTB em parceria com a Vice-Presidência de Pesquisa e Coleções Biológica (VPPCB) da Fiocruz.

5.10 Análise estatística

Os dados foram analisados e descartados os “outliers” (discrepâncias) pelo método ROUT, considerando $Q = 1\%$ e, posteriormente, realizada a análise descritiva. Os dados foram apresentados em quadros como médias e erros padrões da média (EPM). Os resultados foram avaliados através de teste T de amostra independente, pela utilização de Análise de Variância univariadas (uANOVAs), de acordo com a variável estudada. ANOVAs de menor ordem foram utilizadas sempre que houve interação entre os fatores. Diferenças entre grupos individuais foram submetidos a análise post-hoc pelo teste de Dunnett. As interações entre os parâmetros estudados foram mensuradas através da Análise de Regressão Simples. As análises não paramétricas foram avaliadas pelo teste de Kruskal Wallis. Para fins de comparação foi assumido um valor de significância de $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Macroscopia

Dos parâmetros macroscópicos analisados, o dessecamento tegumentar não foi observado em nenhum dos grupos estudados (Tabela 1). Em relação à pseudomelanose e hipóstase cadavérica, foram observados apenas no grupo G3, onde, em ambos os processos ocorreram em 50% dos casos estudados. Já com relação ao estado geral da carcaça avaliado pela macroscopia, houve diferença estatisticamente significativa dos grupos G2 e G3 em relação ao grupo G1 ($P=0,004$ e $P=0,001$, respectivamente) (Figuras 11 e 12).

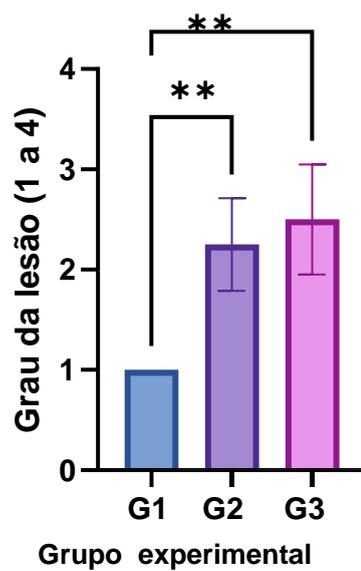
Tabela 1: Avaliação quanto ao percentual das alterações macroscópicas *post mortem* da pele da espécie *Macaca mulatta*.

Alterações cadavéricas <i>post mortem</i>	G1	G2	G3
Dessecamento tegumentar - Presente	0%	0%	0%
Hipóstase cadavérica - Presente	0	0	50%
Estado macroscópico geral da pele - Ótimo	100%	0%	0%
Estado macroscópico geral da pele - Bom	0	75%	50%
Estado macroscópico geral da pele - Regular	0%	25%	50%
Pseudomelanose - Presente	0	0	50%

G1 (grupo controle) - Animais submetidos à eutanásia e coleta imediata do material biológico; G2 (grupo experimental) – Animais submetidos à eutanásia e congelados a temperatura de -20°C para posterior coleta do material; G3 (grupo experimental) – Animais encontrados mortos no recinto, congelados à -20°C para posterior coleta do material.

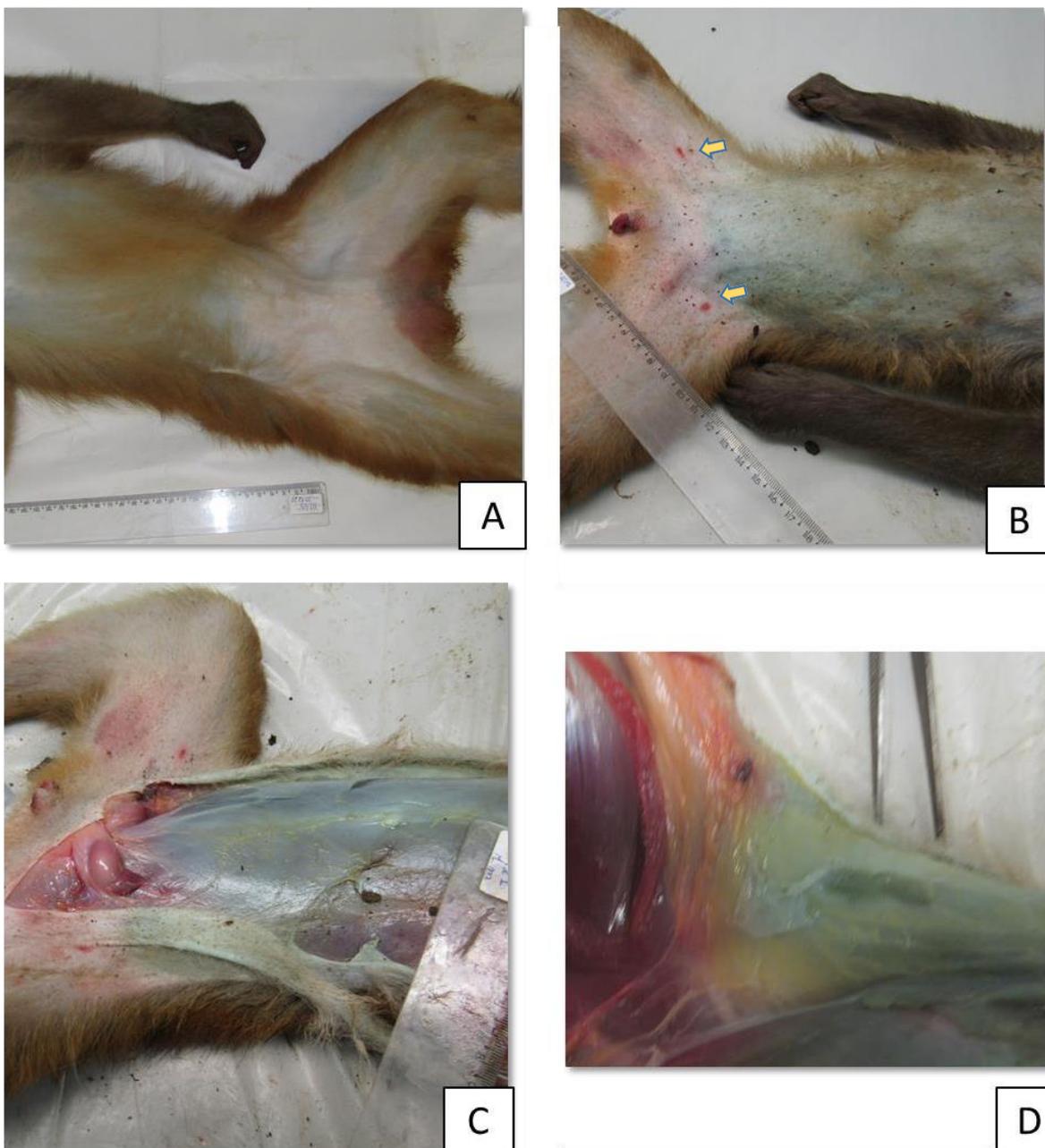
Figura 11: Grau de alterações da macroscópicas da pele entre os grupos experimentais do biomodelo *Macaca mulatta*.

Grau de alteração da macroscopia tegumentar



G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e posteriormente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e congelados após 12-24h. (Grau 1 -ótimo; grau 2 - bom; grau 3 - regular).**P<0,01.

Figura 12: Pseudomelanose da região abdominal e *livor mortis* na pele da região inguinal e face interna das coxas da espécie *Macaca mulatta*.



Região abdominal carcaça de *Macaca mulatta* – **A:** Pele região demonstrando tonalidade em uma carcaça fresca; **B:** Região inguinal e face interna da coxa apresenta áreas de tonalidade avermelhadas difusas pela pele em consequência do *livor mortis*, são observados dois hematomas circulares bilateral (setas); pele demonstrado tonalidade esverdeada característica de pseudomelanose. **C:** Região subcutânea demonstrando tonalidade esverdeada característica de pseudomelanose. **D:** Detalhe da região subcutânea com tonalidade esverdeada.

6.2 Histologia

6.2.1 Achados histológicos da pele normal encontrados no biomodelo *Macaca mulatta*

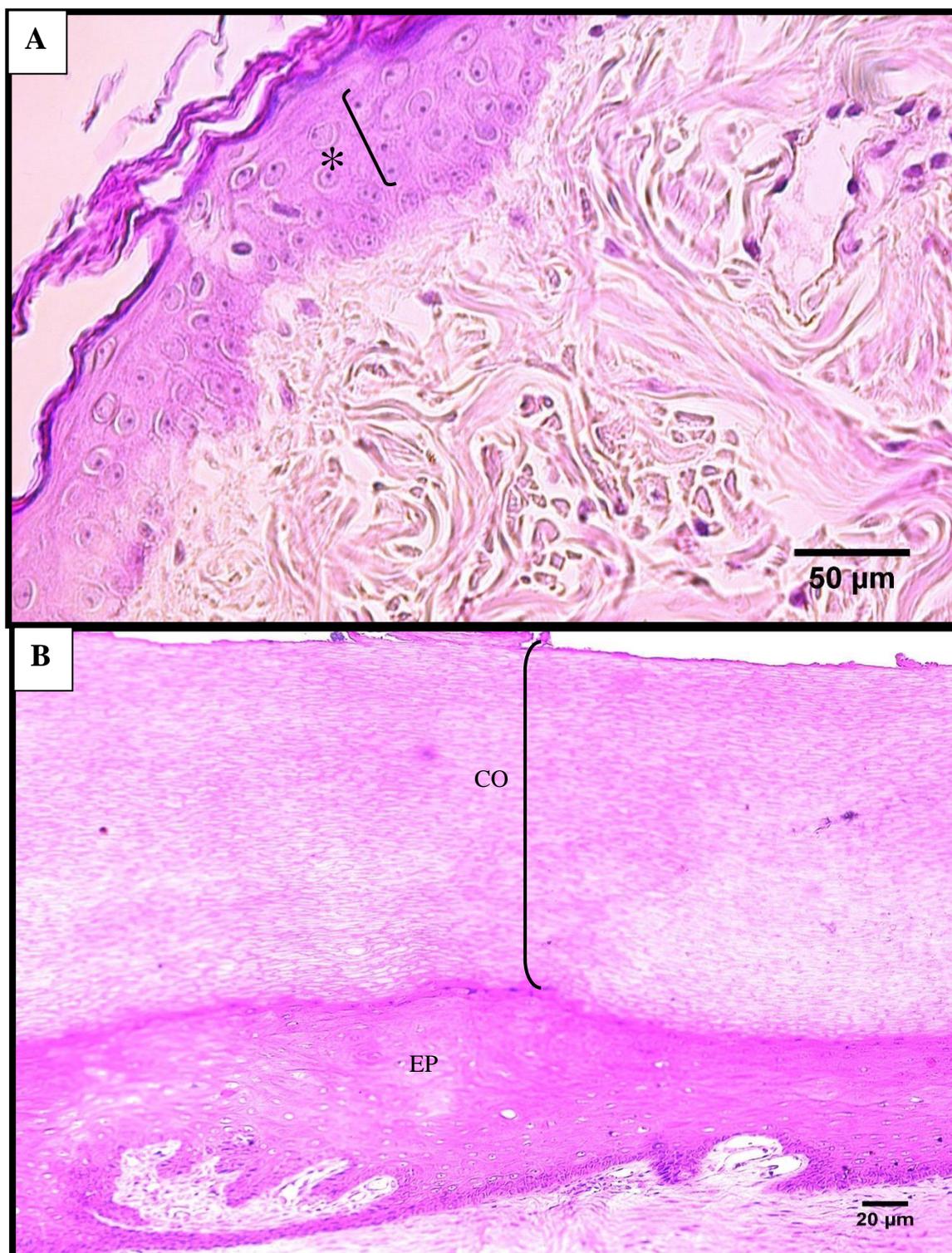
Foi realizado um breve estudo da histologia cutânea da espécie *Macaca mulatta* no qual foram utilizadas imagens de microscopia óptica e realizado registro fotográfico. Na pele das regiões parietal superior medial, cervical posterior, torácica intermamária, torácica interescapular, ventral e sacral, observou-se que a epiderme apresentou a camada espinhosa com cerca de duas a quatro camadas de células (Figura 13 A) e a camada granulosa aparentemente descontínua composta por grânulos de querato-hialina como nas descrições bibliográficas anteriores (Figura 13A). Nestas regiões foi possível observar uma espessura média de epiderme variando de 11,46 μm na região cervical, a 13,71 μm na região sacral, com espessura média da camada córnea variando de 2,18 μm na região ventral a 5,11 μm na região intermamária.

Nas regiões que sofrem frequentemente atrito como a palmar, plantar e a calosidade isquiática, pode-se observar um estrato granuloso bem proeminente, com uma densa camada córnea, intensamente queratinizada (Figura 13 B). Nessas regiões, foi possível verificar a presença de cristas epidérmicas bem definidas e a presença de 8 a 20 camadas de células da camada malpighiana (Figuras 13 B e 14). A presença de células epidérmicas contendo grânulos de queratina foi observada principalmente na camada basal (Figura 14 e 15 A). Nas regiões de calosidade isquiática, a epiderme encontra-se disposta paralelamente à derme, sem a presença de cristas epidérmicas tão evidentes. Ainda, estas regiões apresentaram ocorrência de dermatite em 17% dos casos, mesmo sem apresentar características macroscópicas do processo, indicando esta ser uma lesão de background importante em estudos cutâneos.

Com relação aos folículos pilosos pode-se observar uma frequência de crescimento em grupo de dois a três folículos e, nos folículos ativos é possível verificar a presença de numerosos grânulos de melanina dispersos no bulbo capilar (Figura 16 A e 17 A e B) e nas regiões do córtex do pelo. Estes grânulos normalmente se apresentam com tonalidade que variam de castanho amarelado a tons mais enegrecidos (Figura 16 A).

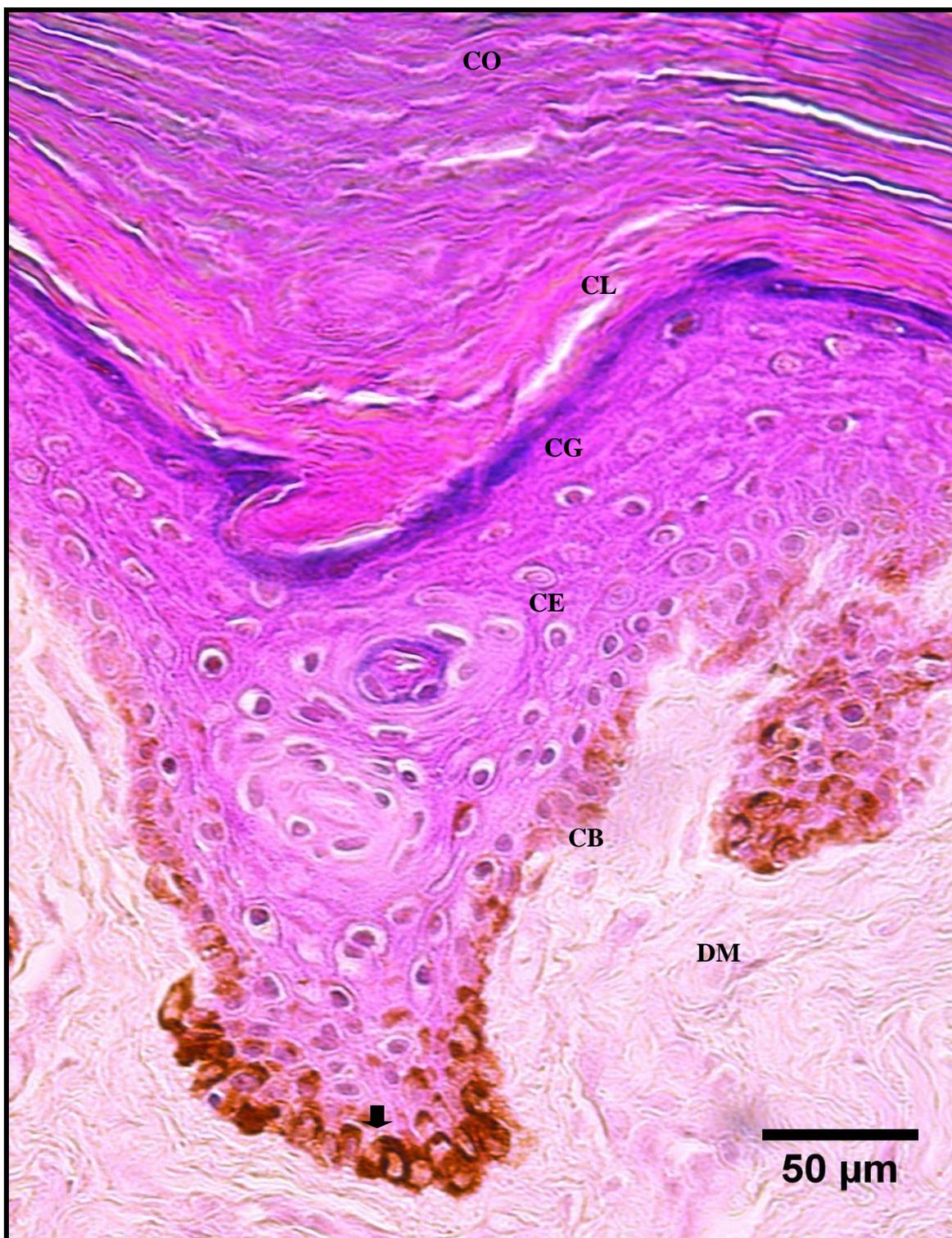
As glândulas sebáceas (Figura 18 A e B) normalmente encontram-se anexas ao folículo piloso, assim como o músculo piloerector (Figura 17A). As glândulas sudoríparas são frequentemente mais numerosa nas regiões de fricção da pele, onde apresentou-se neste trabalho com maior frequência nas região palmar e plantar, e foi possível observar a disposição destas glândulas na região subcutânea da pele, como também na região da derme reticular, desembocando e liberando seu conteúdo na luz externa através do ducto condutor (Figura 19 A e B).

Figura 13: Pele fina (Torácica intermamária) e pele grossa (Calosidade isquiática) do bimodelo *Macaca mulatta*.



A – Epiderme (EP), é possível notar a distribuição das células da camada malpighiana, apresentando cerca de 3 camadas de células (*); **B** – Camada Córnea (CO), apresenta-se grossa na região de pele de maior fricção, Epiderme (EP) da região torácica (A) e da região palmar (B). H&E, Obj. 40X e 10X.

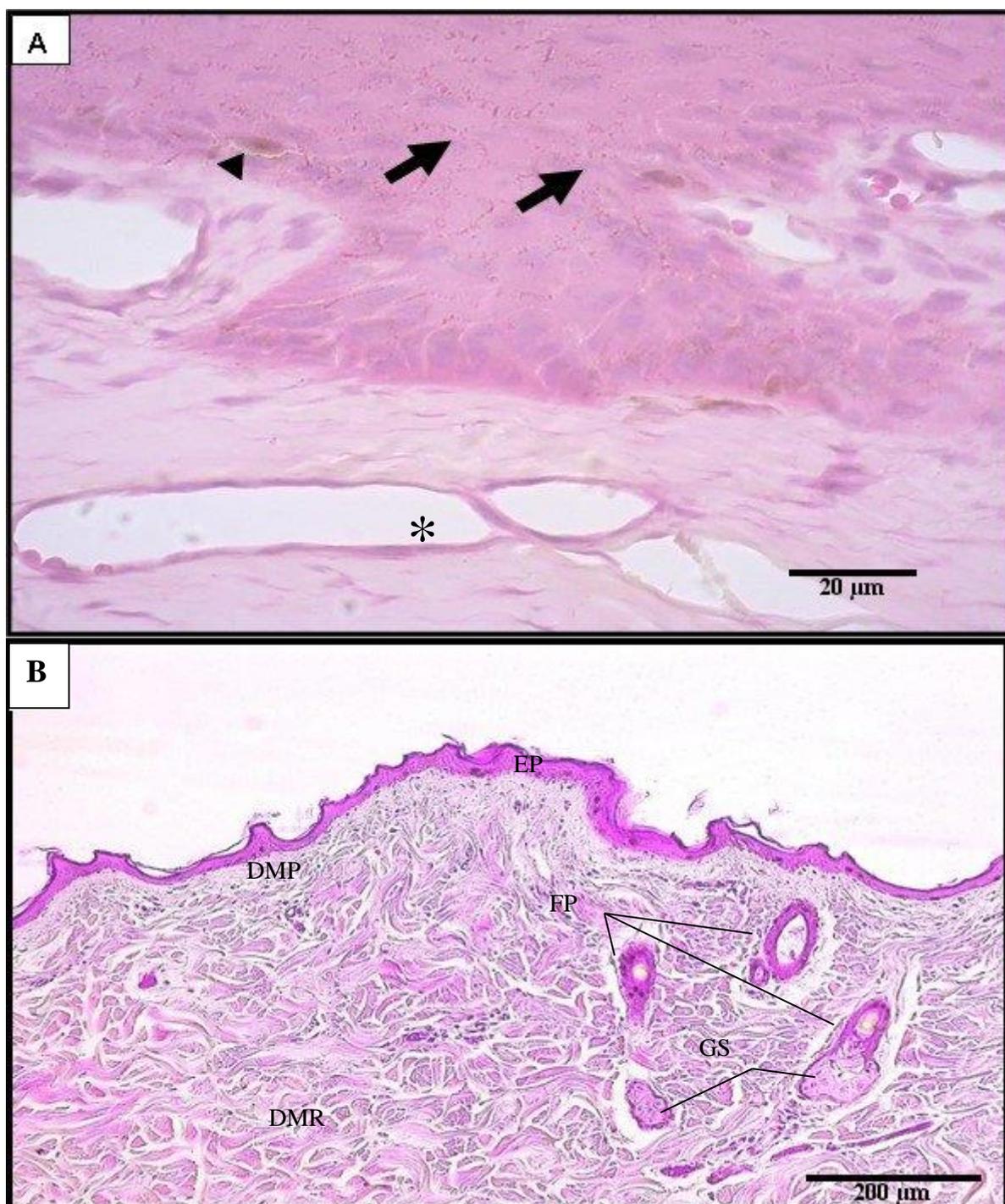
Figura 14: Pele grossa da região palmar do bimodelo *Macaca mulatta*.



Camada córnea (CO), Camada lúcida (CL), Camada granulosa (CG), Camada espinhosa (CE), Camada basal (CB), demonstrando queratinócitos com grânulos de melanina (setas) e Derme papilar (DMP)

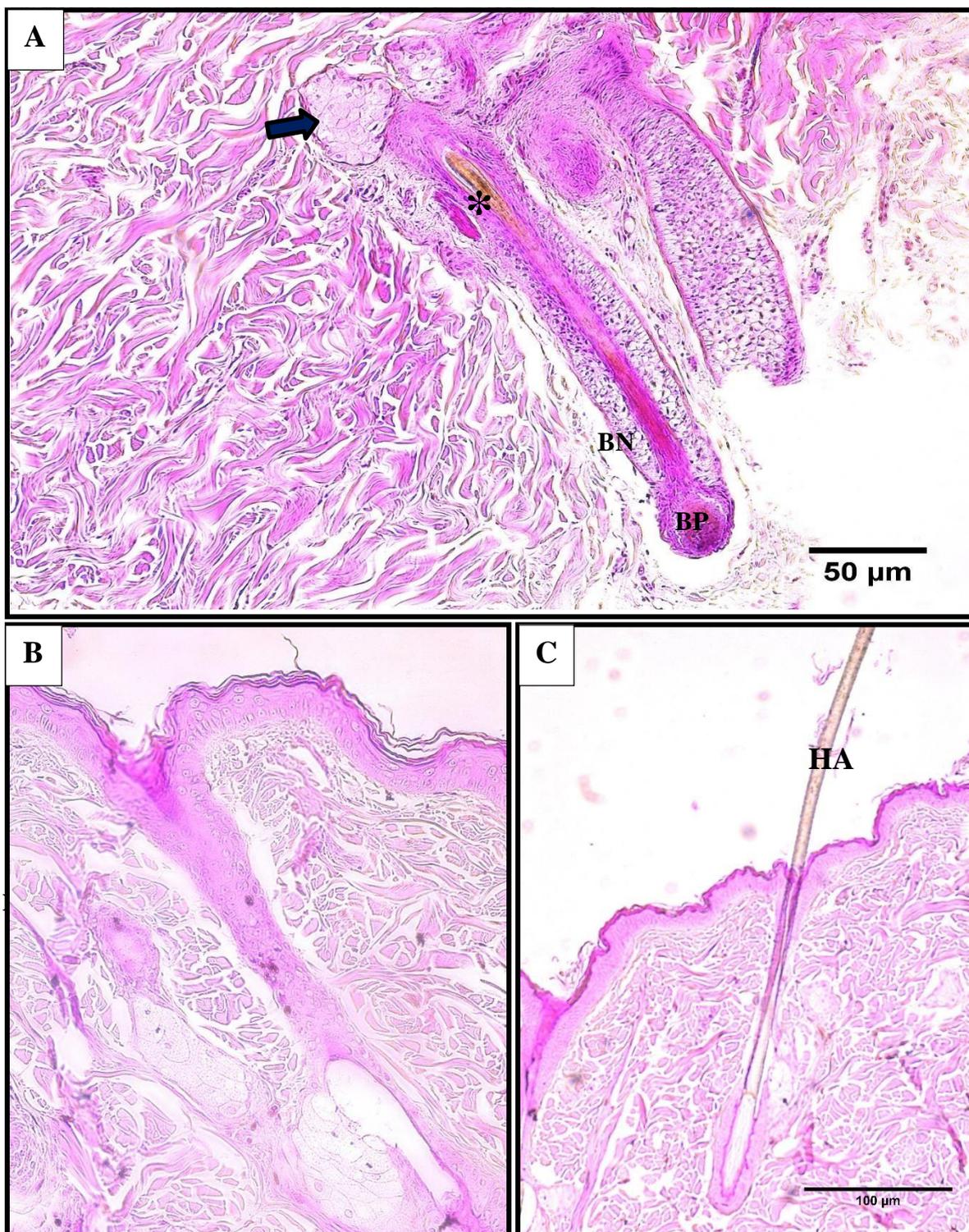
H&E. Obj 40X.

Figura 15: Pele das regiões calosidade isquiática: (A) e região sacral do biomodelo *Macaca mulatta*.



A- Fotomicrografia evidenciando a camada espinhosa com pontes intercelulares nítidas (seta), células intraepidérmica contendo melanina (cabeça de seta) e presença de vasos dérmicos (*); B – Epiderme (EP), Derme papilar (DMP), Derme reticular (DMR), Folículos pilosos (FP) e glândulas sebáceas (GS). H&E. Obj 100X, 10X, respectivamente.

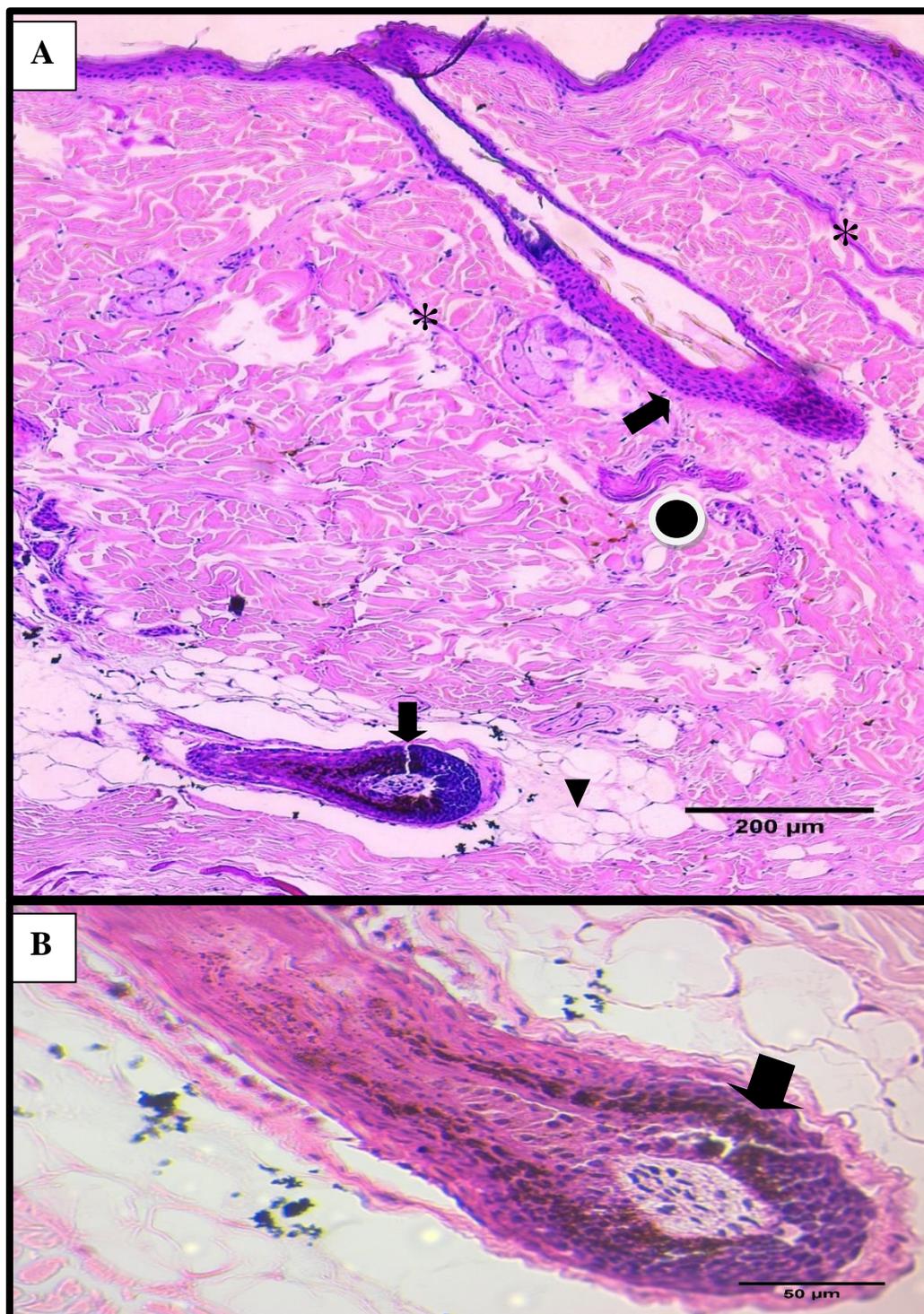
Figura 16: Pele das regiões cervical posterior (A) e parietal superior medial (B) e (C) do biomodelo *Macaca mulatta*.



A – Bulbo piloso (BP), Bainha do pelo (BN). Presença de glândula sebácea anexa ao folículo piloso (seta), e presença de grânulos de melanina (*) na medula do pelo; **B** – Glândula sebácea anexa ao folículo piloso (*); **C** – Haste (HA) do pelo.

H&E, Obj 10X e 5X, respectivamente.

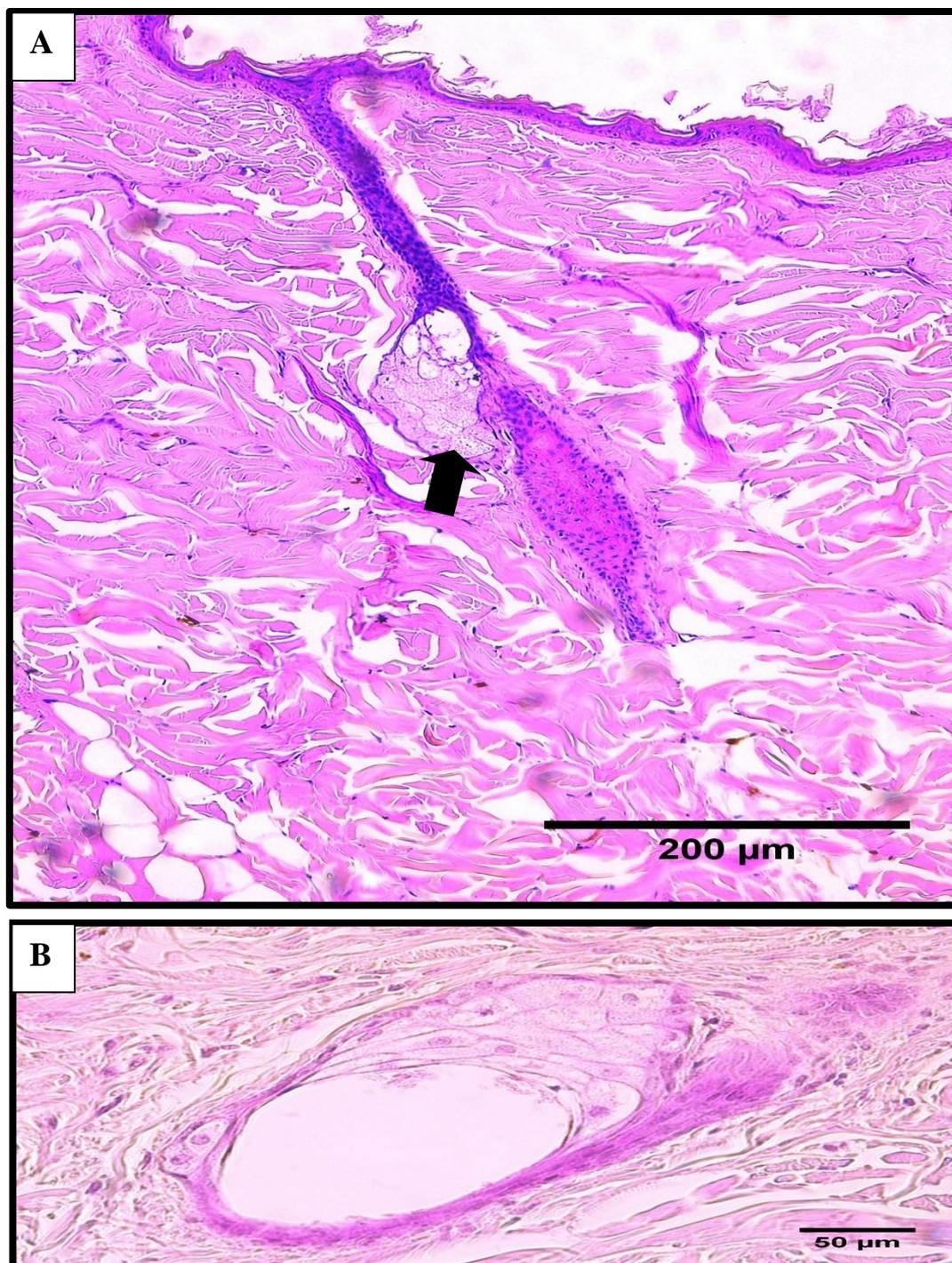
Figura 17: Pele da região parietal superior medial do biomodelo *Macaca mulatta*



A – Nota-se o bulbo piloso desta região repleto de grânulos de melanina (seta); presença de vasos sanguíneos ao longo da camada dérmica da pele (*). Também é possível observar a presença de tecido adiposo característico da região subcutânea (cabeça da seta) e o músculo piloerector (círculo) **B** – Fotomicrografia evidenciando o bulbo piloso (seta).

H&E, Obj 10X e 40X, respectivamente.

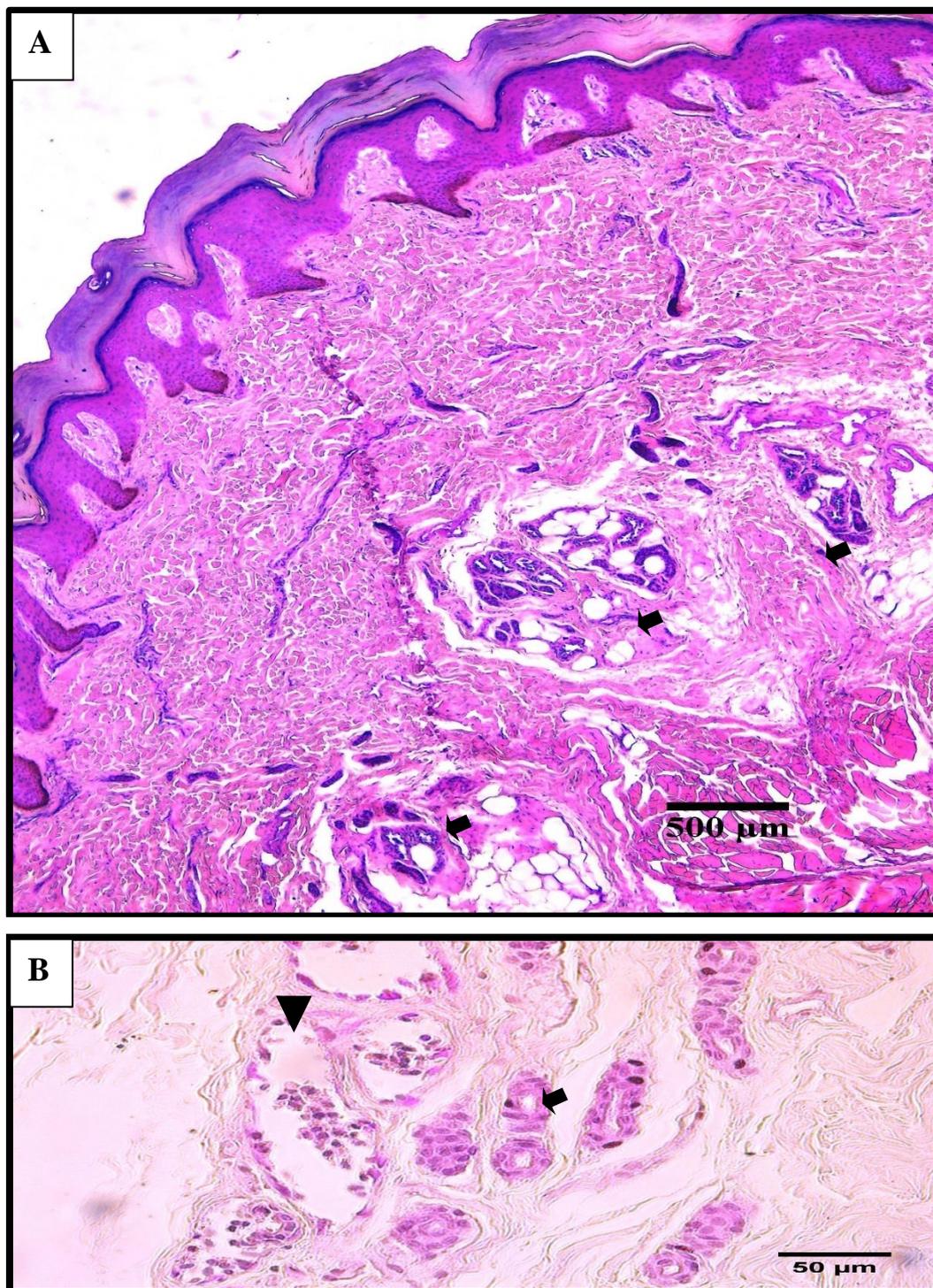
Figura 18: Pele da região sacral do biomodelo *Macaca Mulatta*.



A – Fotomicrografia evidenciando a presença da glândula sebácea (seta) anexa ao folículo piloso em um corte longitudinal. **B** – Fotomicrografia em um maior aumento da glândula sebácea (*), corte transversal.

H&E, Obj. 10X e 40X, respectivamente.

Figura 19: Pele grossa da região palmar do biomodelo *Macaca mulatta*.



A e B, Fotomicrografia evidenciando a glândula sudorípara em um corte transversal (seta).

H&E, Obj de 5X e 40X, respectivamente.

6.2.2 Avaliação da viabilidade das amostras para inclusão no estudo histológico

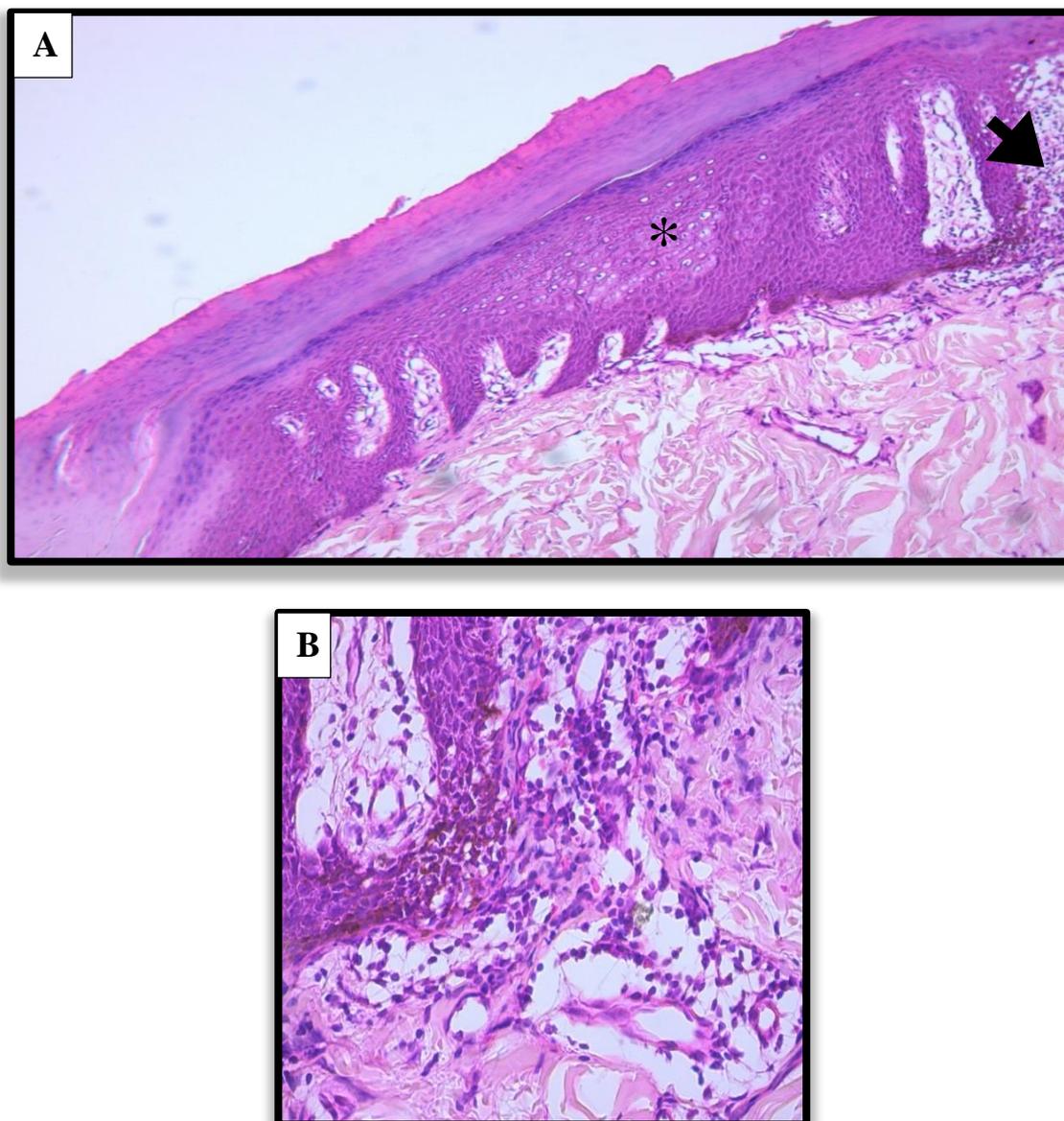
Além do correto posicionamento da amostra e qualidade das lâminas, um parâmetro utilizado para exclusão foi a presença de dermatite na região coletada (Quadro 5). Durante a análise foi possível observar quadros recorrentes de dermatite nas regiões palmar (20,00%), plantar (26,31%) e calosidade isquiática (17,65%) (Figuras 13 e 14), mesmo sem evidência de alterações macroscópicas.

Quadro 5: Percentual de casos de dermatite avaliados nos animais do estudo (*Macaca Mulatta*).

Triagem Microscópica das lâminas quanto à integridade do material para análise									
	PA	CE	TORIM	TORES	SA	VE	PL	PT	CI
ADEQUADO	94,74	94,74	100	100	100	94,73	80	73,68	82,35
DERMATITE	5,26	5,26	0	0	0	5,26	20	26,31	17,65

PA – Região parietal superior medial; CE – Região cervical posterior; TORIM – Região torácia intermamária; TORES – Região torácica interescapular; SA – Região sacral; VE – Região ventral quadrante inferior esquerdo; PL – Região palmar; PT – Região plantar; CI – calosidade isquiática.

Figura 20: Casos de dermatite encontrados no biomodelo estudado *Macaca mulatta*.

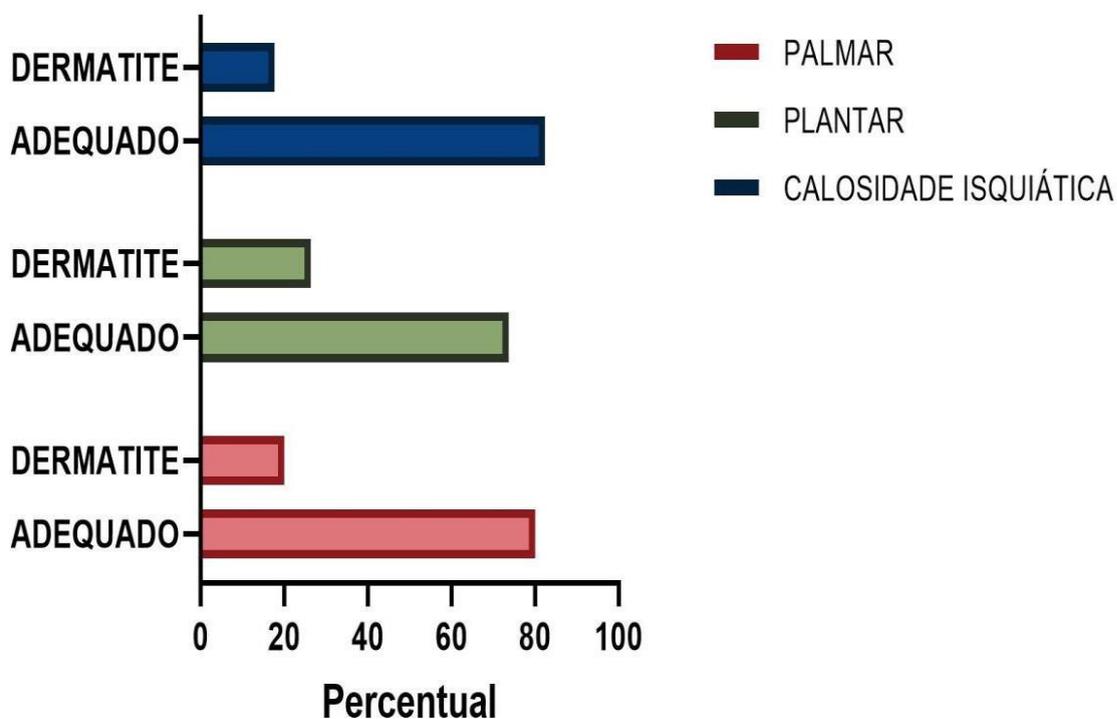


Fotomicrografia representativa referente as regiões plantar apresentando lesão característica de dermatite. **A** – Foco de dermatite crônica (seta) e espongiose (*); **B** – Detalhe da inflamação evidenciando predomínio de monoclureares.

H&E, A, B: (Obj de 40X); C: (Obj de 10X); D: (Obj de 100X).

As amostras com dermatite foram excluídas do estudo e, após avaliação, foram considerados passíveis de análise as regiões que apresentaram um percentual maior de 90% de viabilidade das amostras, já que as lesões podem interferir nos parâmetros a serem analisados.

Figura 21: Percentual de casos de dermatite nas regiões tegumentares de *Macaca mulatta* avaliados no estudo.



Regiões: palmar (20,0%); plantar (26,3%) e calosidade isquiática (17,7) apresentaram um percentual de quadros de dermatite em mais de 10% dos casos avaliados.

6.2.3 Avaliação da relação entre o tempo de vida dos símios estudados, o escore corporal, e os parâmetros da espessura da epiderme e da camada córnea

Ainda, em relação ao tempo de vida dos símios estudados, foram utilizados animais adultos com diferentes idades e, portanto, foi avaliado o impacto da idade e do escore corporal (Figura 15) nos parâmetros analisados através da análise de regressão simples, porém não houve relação significativa pela análise de regressão (Quadro 6 e 7).

Quadro 6: Análise descritiva de regressão simples relacionados à variação de idade da epiderme e da camada córnea dentro do grupo experimental de *Macaca mulatta*.

	PA EP	PA CO	CE EP	CE CO	TORIM EP	TORIM CO	TORES EP	TORES CO	SA EP	SA CO	VE EP	VE CO
Valor de P	0.6906	0.4481	0.9202	0.5336	0.3692	0.7616	0.9040	0.4238	0.7467	0.8136	0.2996	0.8652

PA: Região parietal superior medial; CE: Região cervical posterior; TORIM: Região torácica intermamária; TORES: Região torácica interescapular; SA: Região sacral; VE: Região ventral quadrante inferior esquerdo; Epiderme; CO: Camada córnea da epiderme.

Nota: Não houve relação significativa entre a espessura da epiderme e da camada córnea em relação à idade entre as áreas analisadas.

Quadro 7: Análise descritiva de regressão simples relacionados à variação do escore corporal.

	PA EP	PA CO	CE EP	CE CO	TORIM EP	TORIM CO	TORES EP	TORES CO	SA EP	SA CO	VE EP	VE CO
Valor de P	0,2829	0,1824	0,2492	0,6315	0,5768	0,4912	0,9811	0,4014	0,6799	0,7179	0,1884	0,1759

Região Parietal superior medial; CE: Região cervical posterior; TORIM: Região torácica intermamária; TORES: Região Torácica interescapular; SA: Região sacral; VE: Região ventral quadrante inferior esquerdo; Epiderme; CO: Camada córnea da epiderme.

Nota: Não houve relação significativa entre a espessura da epiderme e da camada córnea em relação ao escore corporal entre as áreas analisadas.

Figura 22: Diferentes escores corporais encontrados nas carcaças estudadas de *Macaca mulatta*.



Carcças de *Macaca mulatta* apresentando diferentes escores corporais; A: Escore 2 magro, B: escore 3 normal, escore 4 sobrepeso.

Após esta avaliação inicial, procedeu-se a análise dos demais parâmetros.

6.2.4 Análise histopatológica semi-quantitativa

Para execução da análise histopatológica as lâminas foram examinadas através de microscopia óptica onde foi avaliado o grau de destacamento, compactação e a presença da camada córnea, grau de condensação basifílica, perda da morfologia da camada basal, grau da degeneração hidrópica e a topografia da degeneração hidrópica. As lesões foram graduadas de acordo com o grau da extensão da lesão em grau 1 ($0% < 10%$), grau 2 (10-50%), grau 3 ($> 50%$).

6.2.4.1 Preservação da camada córnea

Em todos os animais avaliados, independente do grupo, observou-se a presença da camada córnea (Tabela 2), não havendo diferenças quanto a este fator.

Tabela 2: Avaliação quanto ao percentual de presença da camada córnea na espécie *Macaca mulatta*.

Presença da camada córnea			
Região	G1	G2	G3
Parietal	100.00%	100.00%	100.00%
Cervical	100.00%	100.00%	100.00%
Torácica Intermamária	100.00%	100.00%	100.00%
Torácica Interescapular	100.00%	100.00%	100.00%
Ventral	100.00%	100.00%	100.00%
Sacral	100.00%	100.00%	100.00%

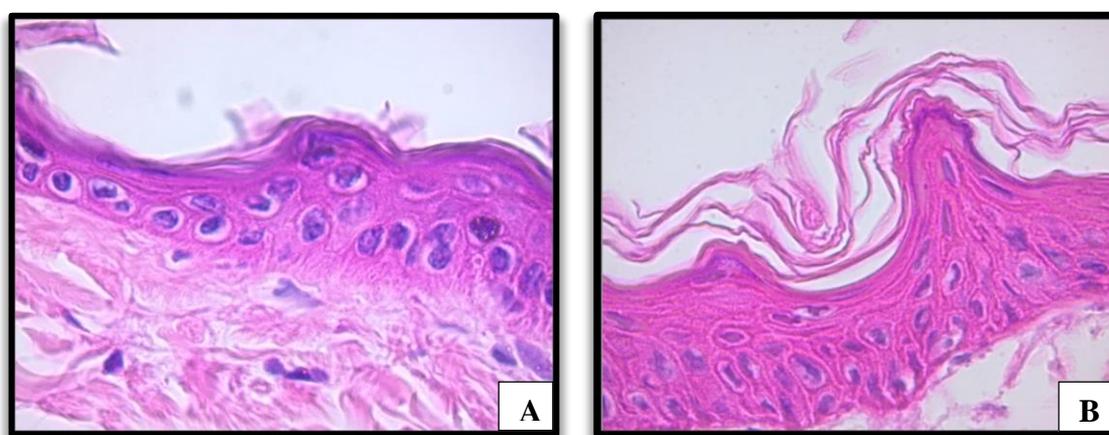
G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados.

Nota: Não houve diferença estatisticamente significativa.

6.2.4.2 Frequência da presença de compactação da camada córnea

Quanto à presença de compactação da camada córnea (Tabela 3), a maioria das regiões apresentou frequências maiores ou iguais a 75%, com exceção das regiões parietal e ventral, onde foi observada uma frequência de 50% nos grupos G3 e G1, respectivamente.

Figura 23: Fotomicrografia representativa da frequência de compactação da camada córnea



Imagens de microscopia óptica (H&E, Obj de 100X) das regiões sacral e torácica intermamária, respectivamente. A: camada córnea compacta; B: camada córnea descompacta.

Tabela 3: Frequência de compactação da camada córnea entre os grupos da espécie *Macaca mulatta*.

Compactação da Camada Córnea			
Região	G1	G2	G3
Parietal	83.33%	87.50%	50.00%
Cervical	80.00%	87.50%	83.33%
Torácica Intermamária	80.00%	75.00%	100.00%
Torácica Interescapular	83.33%	85.71%	75.00%
Ventral	50.00%	75.00%	83.33%
Sacral	80.00%	85.71%	80.00%

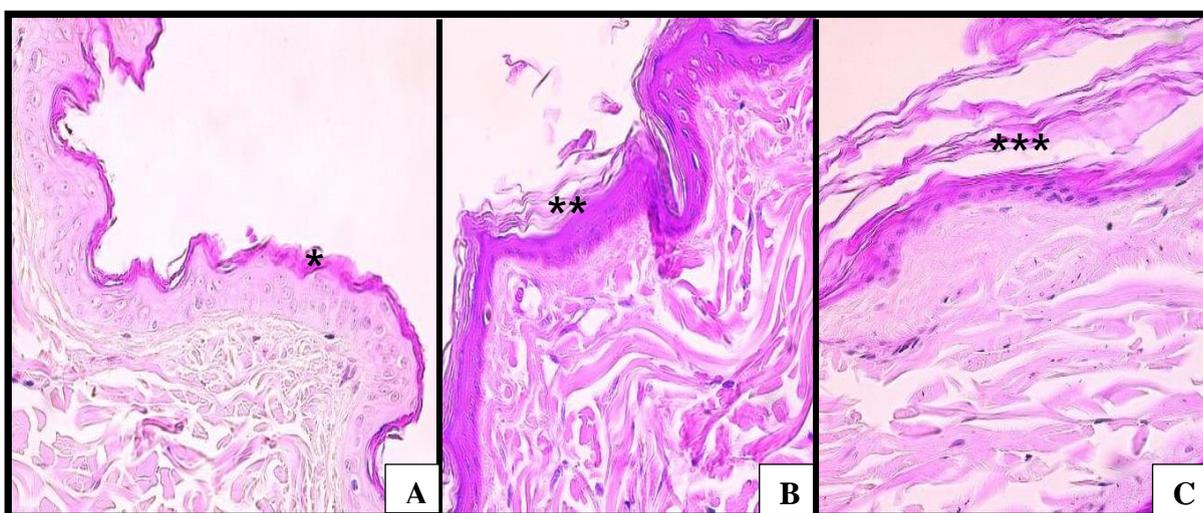
G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados.

Nota: Não houve diferença estatisticamente significativa.

6.2.4.3 Presença de destacamento da camada córnea

Em relação ao grau de destacamento da camada, os animais do grupo controle (G1) apresentavam áreas de destacamento em mais de 50% da extensão da epiderme analisada (grau 2) e não se observou diferença estatisticamente significativa para esta variável entre os grupos estudados, através do teste de Kruskal-Wallis. As lesões foram graduadas em grau 1, grau 2, grau 3 (Figura 16).

Figura 24: Fotomicrografia representativa do grau de destacamento da camada córnea.



Imagens de microscopia óptica (H&E, Obj de 40X) das regiões ventral, cervical e torácica interescapular, respectivamente. **A:** grau 1 ($0% < 10%$; *), a camada córnea encontra-se aderida as demais camadas da epiderme; **B:** grau 2 ($10\% - 50%$; **), a camada córnea começa a se desprender das demais camadas; **C:** grau 3 ($> 50%$; ***), descamação intensa da camada córnea.

Tabela 4: Avaliação quando ao grau de destacamento da camada córnea no biomodelo *Macaca mulatta*.

Região Anatômica	G1 (Média e Desvp)			G2 (Média e Desvp)			G3 (Média e Desvp)			P-Valor
Parietal	2,5	±	0,84	2,63	±	0,74	1,75	±	0,96	0,2764
Cervical	2,6	±	0,55	2,75	±	0,71	2,33	±	1,03	0,5882
Torácica Intermamária	2,6	±	0,55	2,63	±	0,74	2,83	±	0,41	0,9176
Torácica Intescapular	2,83	±	0,41	2,71	±	0,76	2,5	±	1	0,7616
Ventral	2,25	±	0,96	2,13	±	0,99	2,67	±	0,82	0,4997
Sacral	2,67	±	0,82	2,63	±	0,74	2,8	±	0,45	0,9639

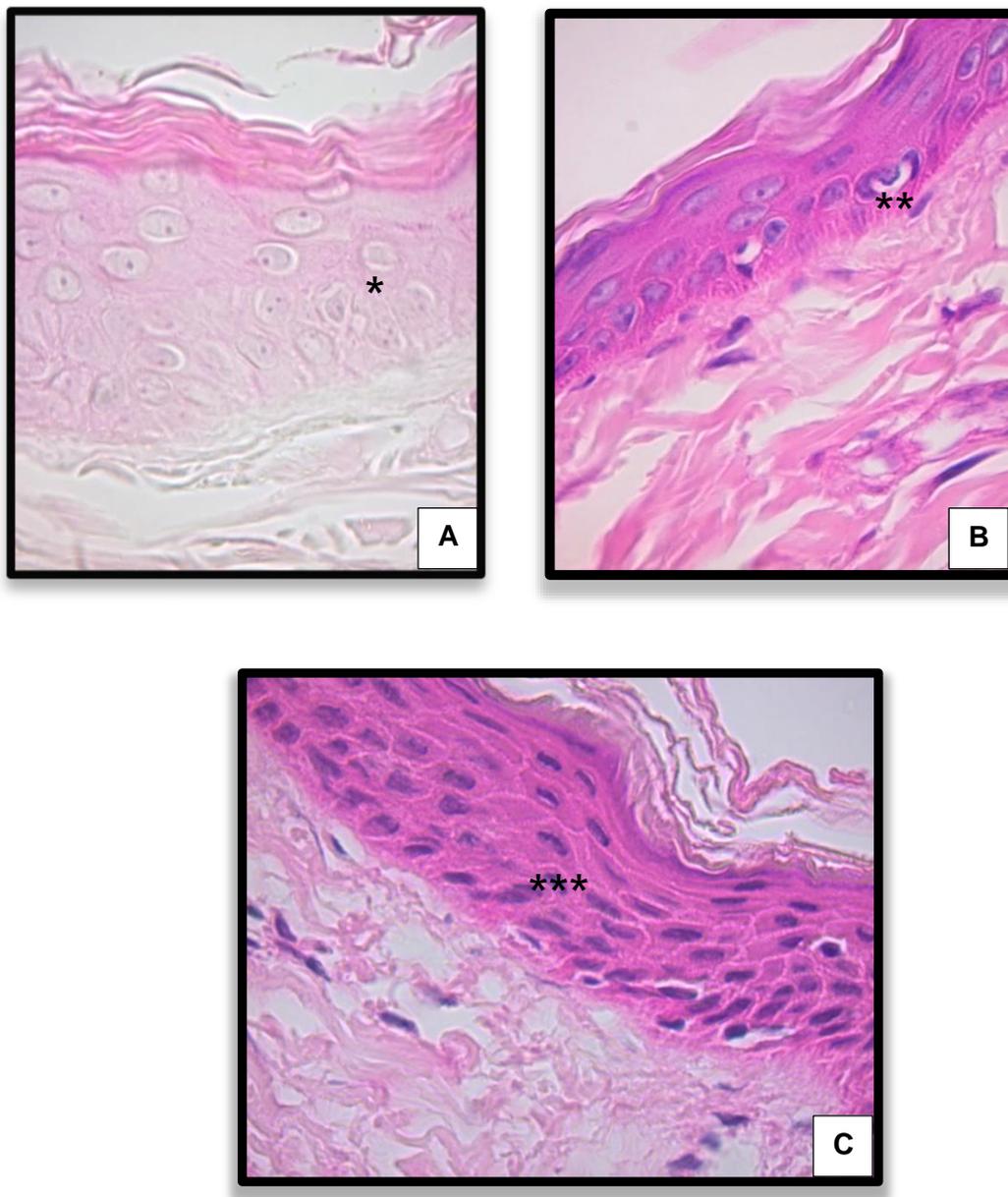
Legenda: G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados.

Nota: Não houve diferença estatisticamente significativa. $P < 0,05$.

6.2.4.4 Avaliação quanto ao grau de condensação basofílica e da perda da morfologia da camada basal

Não houve diferença estatisticamente significativa para o grau de condensação basofílica (Tabela 5, Figura 17) e para o grau de perda da morfologia da camada basal (Tabela 6; Figura 18) entre os grupos estudados em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis).

Figura 25: Fotomicrografia representativa do grau de condensação basofílica.



Imagens de microscopia óptica (H&E, Obj de 100X) das regiões parietal superior medial, cervical posterior e torácica intramamária, respectivamente, *Macaca mulatta*. A: grau 1 (0%-<10%; *); B: grau 2 (10-50%;**); C: grau 3 (>50%;***). O núcleo da célula intensamente basofílico através da observação microscópica (asterístico).

Tabela 5: Avaliação quanto ao grau de condensação basofílica do biomodelo *Macaca mulatta*.

Região Anatômica	G1 (Média e Desvp)		G2 (Média e Desvp)		G3(Média e Desvp)		P-Valor
Parietal	2	± 1,1	2	± 0,93	1	± 0	0,1704
Cervical	1,6	± 0,9	2,38	± 0,92	1,83	± 0,98	0,361
Torácica Intermamária	1,8	± 0,84	2	± 1,07	1,33	± 0,82	0,4529
Torácica Interescapular	1,6	± 0,89	2,38	± 0,92	1,57	± 0,79	0,1844
Ventral	1	± 0	2,25	± 1,04	2,17	± 0,98	0,1272
Sacral	1,67	± 1,03	2,13	± 0,99	1,8	± 1,1	0,6388

G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados.

Nota: Não houve diferença significativa.

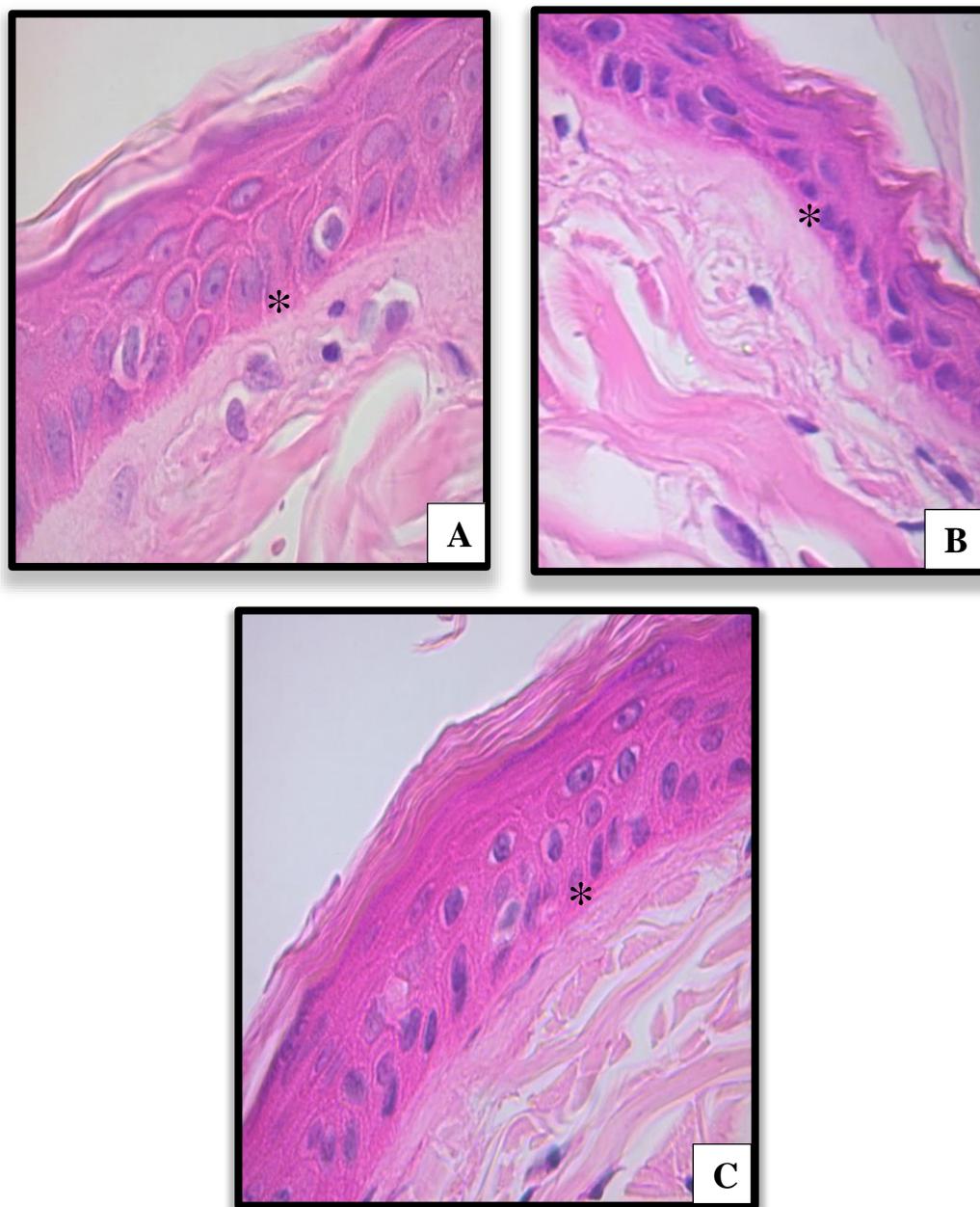
Tabela 6: Avaliação quanto ao grau de perda da morfologia basal da epiderme do biomodelo *Macaca mulatta*.

Região Anatômica	G1 (Média e Desvp)		G2 (Média e Desvp)		G3(Média e Desvp)		P-Valor
Parietal	3	± 0	2,63	± 0,74	3	± 0	0,32
Cervical	2,17	± 0,75	2	± 1	2,67	± 0,82	0,37
Torácica Interescapular	2,17	± 0,75	2	± 1	2,57	± 0,79	0,48
Torácica Intermamária	2,67	± 0,52	2,43	± 0,98	2,5	± 0,84	0,93
Sacral	2,43	± 0,79	2,86	± 0,38	2,6	± 0,89	0,5
Ventral	2,2	± 0,84	2,14	± 1,07	3	± 0	0,13

G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados.

Nota: Não houve diferença significativa.

Figura 26: Fotomicrografia representativa do grau de perda da morfologia basal da epiderme.



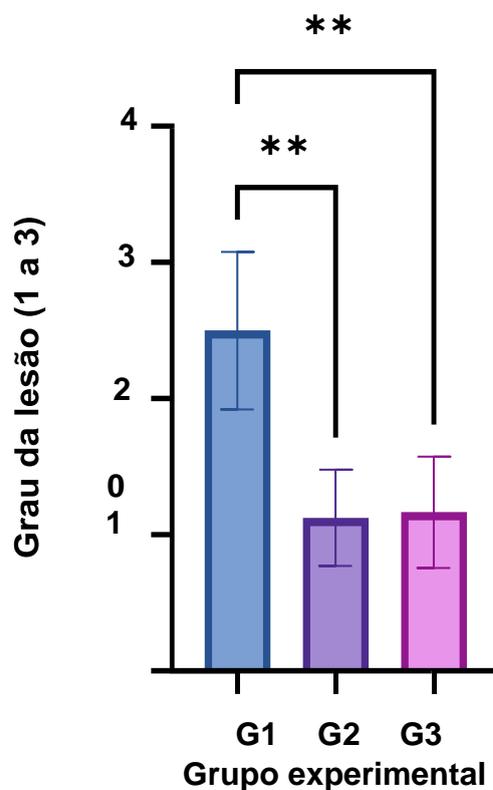
Imagens de microscopia óptica (H&E, Obj de 100X) das regiões torácica interescapular (A), ventral (B) e parietal superior medial (C), de *Macaca mulatta*. A: grau 1 (0%<10%); B: grau 2 (10-50%); C: grau 3 (>50%), perda da morfologia da camada basal em diferentes níveis (*).

6.2.4.5 Avaliação quanto ao grau de degeneração hidrópica

Na avaliação quanto ao grau de degeneração hidrópica, foi possível notar uma diferença significativa na região ventral pelo teste de Kruskal-Wallis ($P=0,002$). A análise com o pós-teste de Dunnett revelou uma diferença tanto entre os grupos G1 e G2**($P=0,0036$), quanto entre os grupos G1 e G3**($P=0,0089$) (Tabela 7; Figuras 19 e 20).

Figura 27: Análise histopatológica da região ventral relacionada ao grau de degeneração hidrópica da epiderme do biomodelo *Macaca mulatta*.

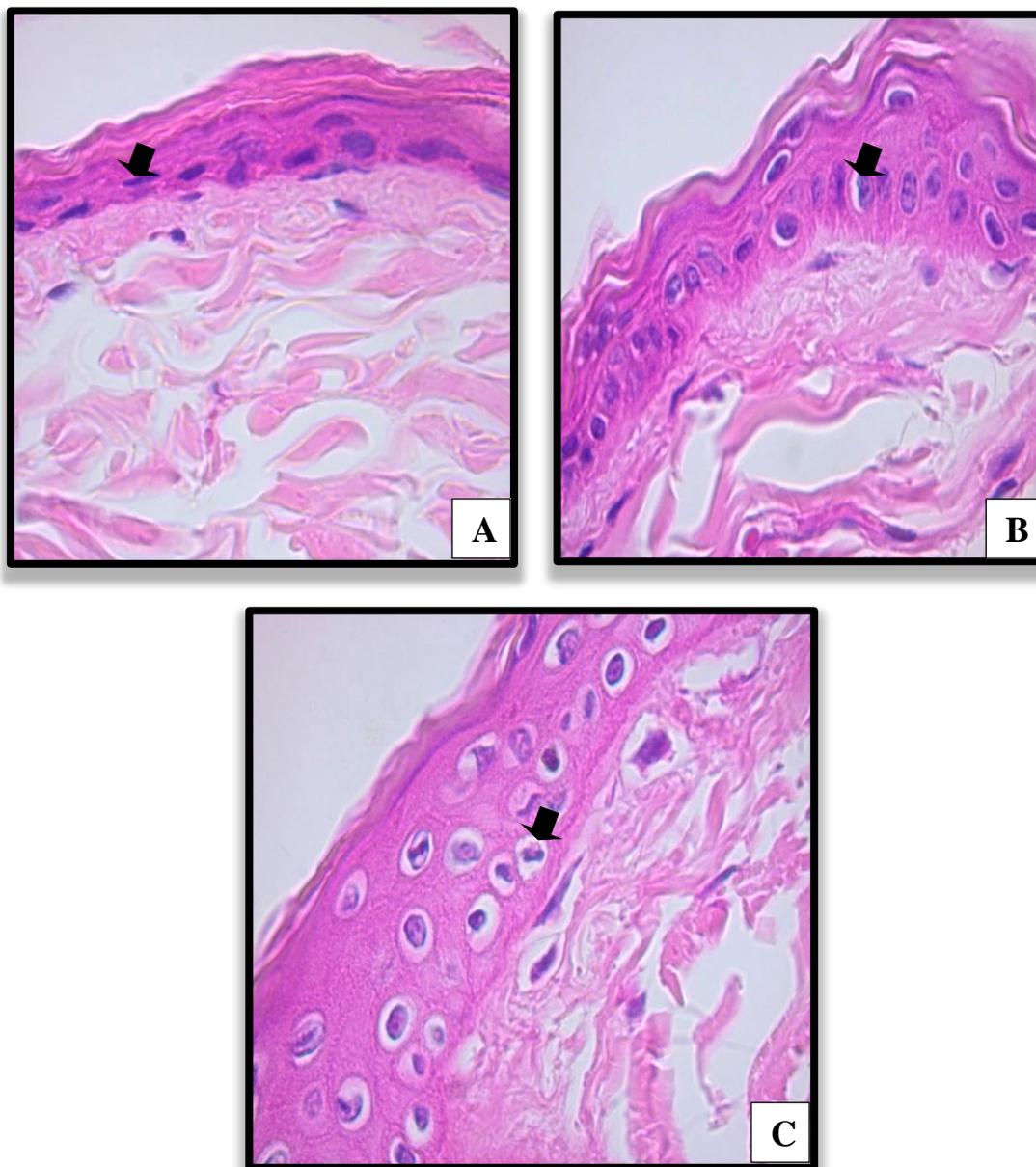
Região Ventral - Grau de degeneração hidrópica



G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados.

* $P<0,05$. Grau 1 (0%-<10%); grau 2 (10-50%); grau 3 (>50%).

Figura 28: Fotomicrografia representativa do grau de degeneração hidrópica



Imagens de microscopia óptica (H&E, Obj de 100X) das regiões torácica intermamária, torácica intermamária, respectivamente, *Macaca mulatta*, demonstrando diferentes graus de degeneração hidrópica da camada espinhosa. A: grau 1 (0%-<10%); B: grau 2 (10-50%); C: grau 3 (>50%). Detalhe (setas).

Tabela 7: Avaliação quanto ao grau de degeneração hidrópica dos grupos experimentais do biomodelo *Macaca mulatta*.

Região Anatômica	G1 (Média e Desvp)			G2 (Média e Desvp)			G3 (Média e Desvp)			P-Valor
Parietal	2	±	1,1	2	±	0,93	1	±	0	0,1704
Cervical	2	±	0,71	1,5	±	0,76	2	±	0,89	0,397
Torácica Intermamária	1,6	±	0,89	1,5	±	0,76	1,83	±	0,98	0,8247
Torácica Intescapular	2	±	0,63	1,5	±	0,76	2,14	±	0,9	0,2893
Ventral	2,5	±	0,58	1,13	±	0,35	1,17	±	0,41	0,0020**
Sacral	2,33	±	0,82	1,63	±	0,92	2	±	1	0,3565

G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados. * P<0,05.

Nota: Houve diferença significativa entre os grupos G1 e G2***(P<0,05); valor de P (0,0008) e entre os grupos G1 e G3 **(P<0,05); valor de P (0,0070) relacionados a região ventral.

Porém, quando avaliada a topografia da degeneração hidrópica na epiderme das regiões estudadas, em todos os casos onde o processo estava presente, sua localização era inespecífica, podendo ocorrer tanto na metade superior quanto em regiões mais próximas a camada basal, independente do grupo estudado.

Tabela 8: Avaliação quanto ao grau de topografia da degeneração hidrópica no biomodelo *Macaca mulatta*.

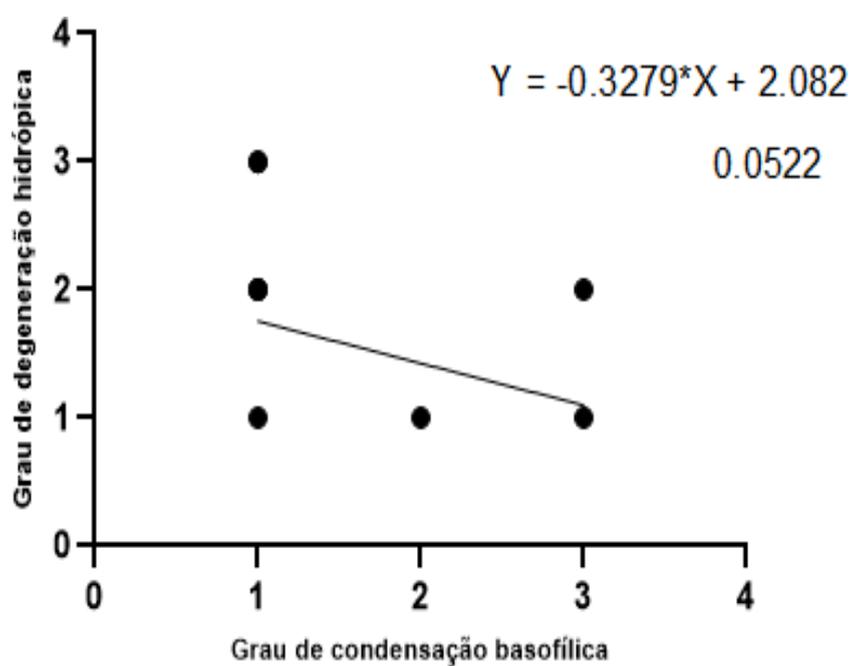
Topografia da degeneração hidrópica			
Região/Classificação	G1	G2	G3
PA- INESPECÍFICA	66.67%	50.00%	100.00%
PA - AUSENTE	33.33%	50.00%	0.00%
PA - METADE SUPERIOR	0.00%	0.00%	0.00%
CE - INESPECÍFICA	100.00%	50.00%	50.00%
CE - AUSENTE	0.00%	50.00%	50.00%
CE - METADE SUPERIOR	0.00%	0.00%	0.00%
TORIM - INESPECÍFICA	100.00%	50.00%	50.00%
TORIM - AUSENTE	0.00%	50.00%	50.00%
TORIM - METADE SUPERIOR	0.00%	0.00%	0.00%
TORES - INESPECÍFICA	83.33%	85.71%	75.00%
TORES - AUSENTE	16.67%	14.29%	25.00%
TORES - METADE SUPERIOR	0.00%	0.00%	0.00%
VE - INESPECÍFICA	100.00%	37.50%	50.00%
VE - AUSENTE	0.00%	62.50%	50.00%
VE - METADE SUPERIOR	0.00%	0.00%	0.00%
SA - INESPECÍFICA	100.00%	75.00%	100.00%
SA - AUSENTE	0.00%	25.00%	0.00%
SA - METADE SUPERIOR	0.00%	0.00%	0.00%

G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados. PA: região parietal superior medial; CE: região cervical posterior; TORIM: região torácica intermamária; TORES: região torácica interescapular; VE: região ventral quadrante inferioresquerdo; SA: região sacral.

6.2.4.6 Relação entre o grau de degeneração hidrópica e a condensação basofílica entre os grupos G1 e G2 e G1 e G3

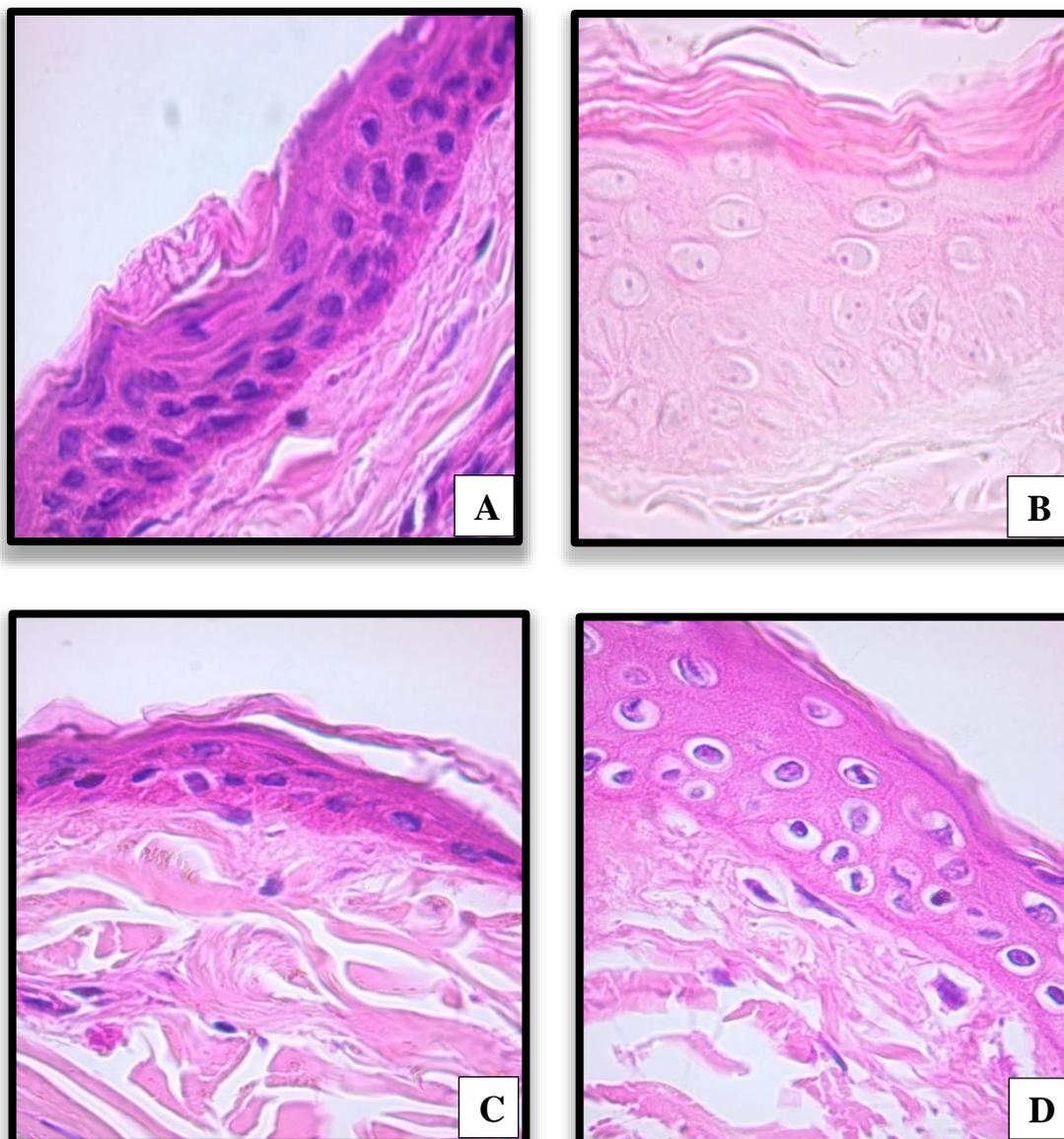
Comparando-se os parâmetros da degeneração hidrópica e da condensação basofílica, foi possível notar uma tendência de redução de degeneração hidrópica entre os grupos do estudo ($P < 0,05$; $Y = -0.3279 * X + 2.0522$) nos animais que apresentaram maior grau de condensação basofílica (Figura 21).

Figura 29: Grau de degeneração hidrópica X condensação basofílica.



Nota: (P-valor: 0.0522); $P < 0.05$.

Figura 30: Fotomicrografia representativa da relação entre a condensação basofílica e a degeneração hidrópica.



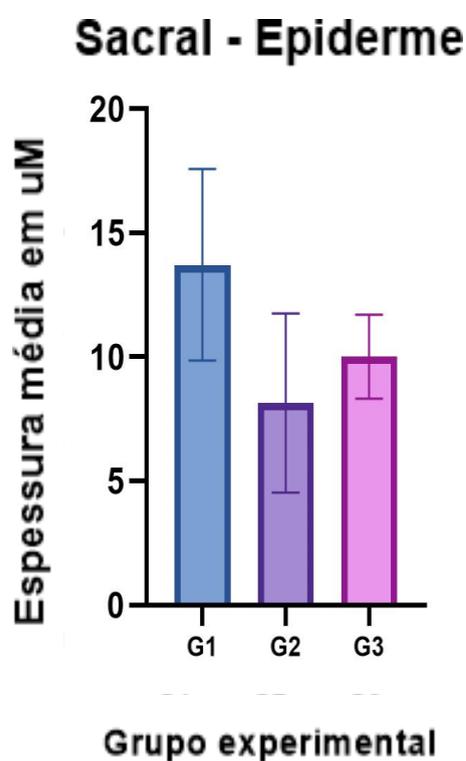
Imagens de microscopia óptica (H&E, Obj de 100X) das regiões **A** e **D**: parietal superior medial (G3), **B**: parietal superior medial (G1), **C**: sacral (G3), *Macaca mulatta*. Relação entre presença de condensação basofílica X degeneração hidrópica. **A** e **C** – células apresentando condensação basofílica (grau 3 de extensão da lesão), **B** e **D** – degeneração hidrópica (grau 3 de extensão da lesão).

6.2.5 Análise Histomorfométrica

6.2.5.1 Epiderme

Com relação à histomorfometria da epiderme, foi possível apenas observar diferença significativa na região sacral da pele ($P=0,02$) (Tabela 9). Ao realizar o pós-teste de Dunnett, observou-se que a diferença foi estatisticamente significativa quando comparados o grupo G1 e G2 ($P=0,01$) (Figura 22).

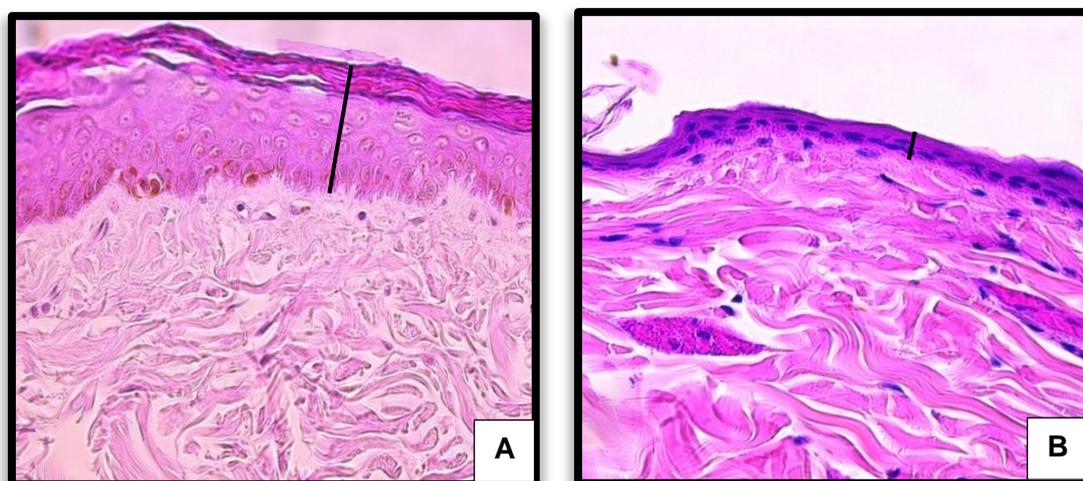
Figura 31: Análise histomorfométrica da região sacral relacionada espessura da epiderme do biomodelo *Macaca mulatta*.



G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados.

* $P<0,05$.

Figura 32: Fotomicrografia representativa da espessura da epiderme referente a região sacral entre os grupos G1 e G2.



Imagens de microscopia óptica (H&E, Obj de 40X) da região sacral de *Macaca mulatta*. A – grupo G1; B – grupo G2. Nota-se diferença na espessura da epiderme entre os dois grupos experimentais (barra).

Tabela 9: Espessura da epiderme no biomodelo *Macaca mulatta* (estatística descritiva e valor de p pela ANOVA).

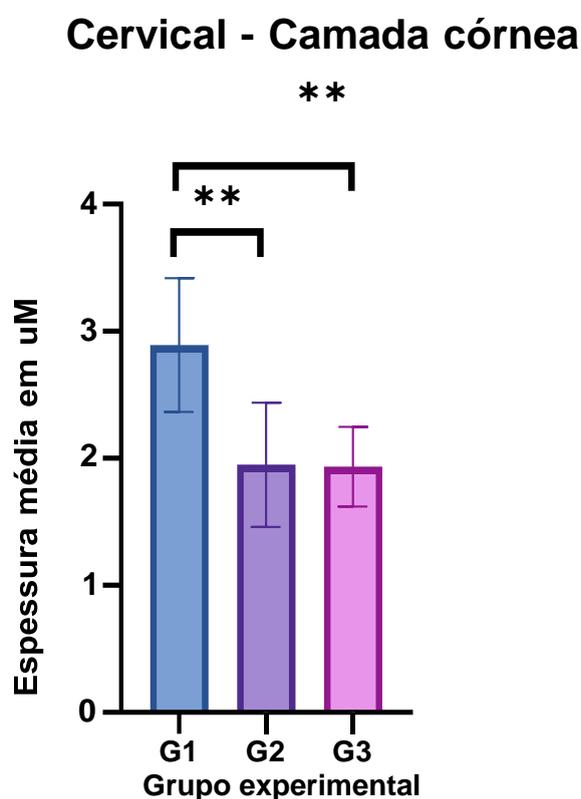
Região Anatômica	G1 (Média e Desvp)	G2 (Média e Desvp)	G3 (Média e Desvp)	P-Valor
Parietal	12,22 ± 6,19	8,93 ± 1,4	13,84 ± 2,9	0,12
Cervical	11,46 ± 1,41	9,69 ± 3,96	10,96 ± 1,96	0,55
Torácica Intramamária	11,55 ± 6,15	9,29 ± 2,38	10,83 ± 2,59	0,55
Torácica Intescapular	11,55 ± 6,15	9,29 ± 2,38	10,83 ± 2,59	0,44
Ventral	12,6 ± 7,47	9,13 ± 3,4	9,16 ± 2,42	0,39
Sacral	13,71 ± 3,86	8,15 ± 3,61	10,02 ± 1,69	0,02

G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental – animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados. Nota: Apresentou diferença estatística a espessura da epiderme relacionados a região sacral entre os grupos experimentais G1 e G2, P (0,0130) *P<0,05.

6.2.5.2 Camada córnea

Já com relação à espessura considerando apenas a camada córnea, foi possível notar diferença significativa relacionada aos dados da região cervical ($P=0,005$) (Tabela 10). No pós-teste de Dunnett, observou-se que a diferença ocorreu entre os grupos experimentais G1 e G2 ($P=0,005$) e os grupos experimentais G1 e G3 ($P=0,009$) (Figura 23).

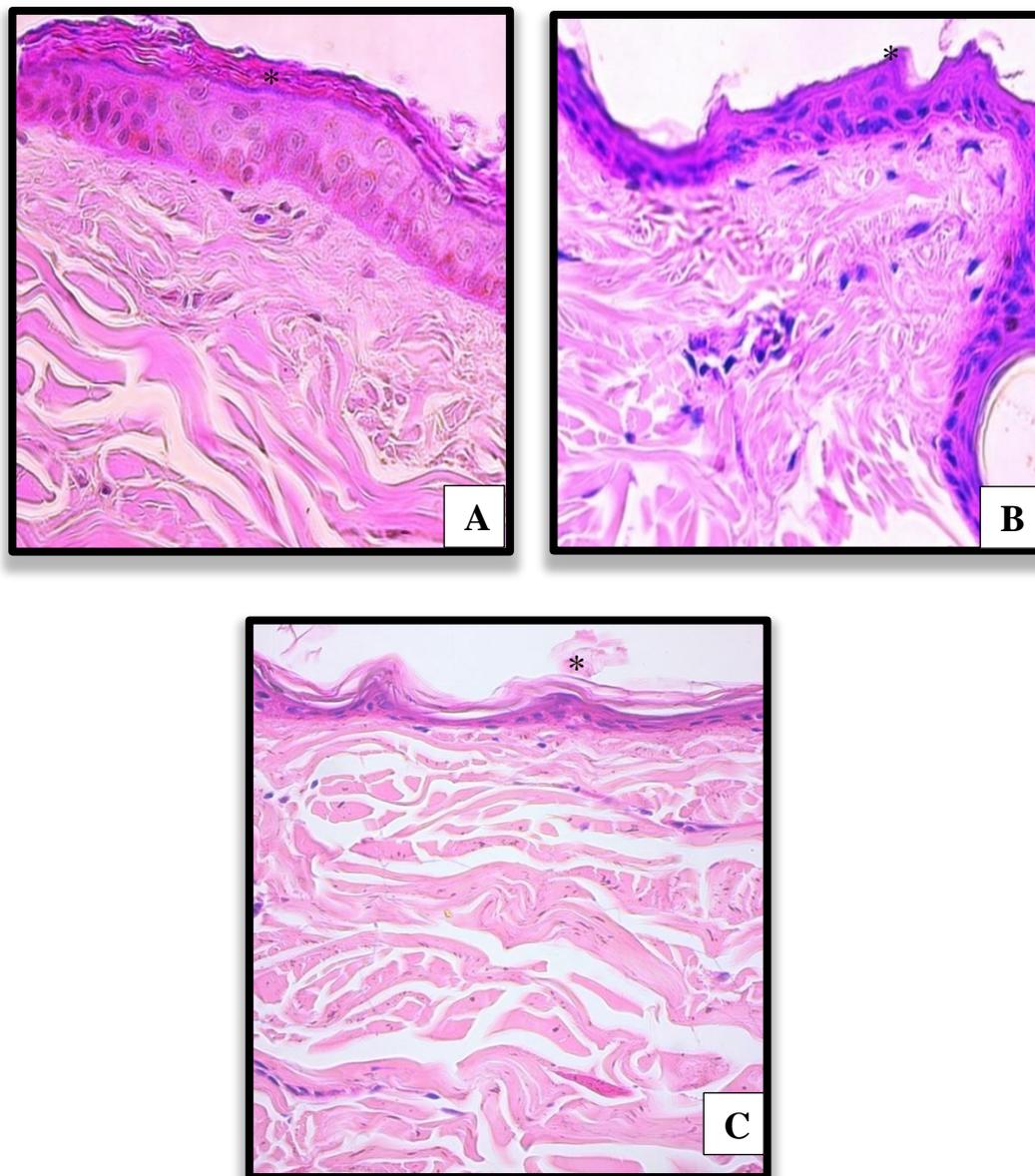
Figura 33: Avaliação da região cervical da camada córnea da epiderme do biomodelo *Macaca mulatta*.



G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados.

Nota: G1 e G2 (P-valor 0,0040) e os grupos experimentais G1 e G3 (P-valor 0,0090) ** $P<0,05$.

Figura 34: Fotomicrografia representativa da diferença de espessura da camada córnea da região cervical.



Imagens de microscopia óptica (H&E, Obj de 40X) da região cervical de *Macaca mulatta*. **A** – grupo G1; **B** – grupo G2; **C** – grupo G3. Nota-se diferença na espessura da camada córnea entre os grupos experimentais G1 - G2 e entre os grupos G1 - G3 (*).

Tabela 10: Espessura da camada córnea da epiderme do biomodelo *Macaca mulatta*.

Região Anatômica	G1 (Média e Desvp)			G2 (Média e Desvp)			G3 (Média e Desvp)			P-Valor
Parietal	2,67	±	1,08	2,61	±	0,75	2,57	±	0,67	0,98
Cervical	2,89	±	0,53	1,95	±	0,49	1,93	±	0,31	0,005**
Torácica Intermamária	5,11	±	4,13	2,29	±	0,85	2,03	±	0,59	0,06
Torácica Intescapular	2,96	±	1,3	2,58	±	1,77	2	±	0,35	0,59
Ventral	2,18	±	1,28	2,15	±	1,06	1,92	±	0,54	0,89
Sacral	3,16	±	0,9	2,21	±	1,08	2,3	±	0,58	0,16

G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados.

Nota: G1 e G2 (P-valor 0,0040) e G1 e G3 (P-valor 0,0090) **P<0,05

6.2.5.3 Análise quanto à temperatura e umidade relativa do ar

Os dados climatológicos referentes ao dia do óbito de cada animal pertencente ao grupo G3 (animais que sofreram exposição a condições climatológicas) foram utilizados comovariável e submetidos à análise estatística de regressão simples para avaliação quanto à interferência relacionada na integridade da estrutura cutânea. Os dados estão dispostos no quadro 8.

Quadro 8: Relação entre a temperatura e a umidade relativa com os dias do óbito dos animais do grupo G3 do biomodelo *Macaca mulatta*.

Animal	Óbito	Mínima (°C)	Máxima (°C)	Média (°C)	UR (%)
1	06/05/2019	24	34,1	28,17	65,47
3	28/12/2018	23,1	30,9	26,76	70,35
13	13/10/2019	22,9	37,6	29,08	59,49
14	26/11/2019	21	31,6	23,72	55,32
16	23/11/2019	23,4	34,6	28,04	63,32
26	14/05/2021	19,2	26,2	21,67	72,20

G3: preservado por congelação após 12-24 horas após o óbito. UR – Umidade relativa do ar.

Fonte: Dados coletados do Sistema Alerta Rio da Prefeitura do Rio de Janeiro, RJ.

Através da Análise de Regressão foi possível verificar que não houve relação estatisticamente significativa entre os dados analisados com relação a influência da temperatura e umidade na espessura da epiderme e da camada córnea nas diferentes regiões nos animais expostos às condições ambientais (G3) (Quadros 9 e 10).

Quadro 9: Influência da temperatura no dia do óbito dos animais do grupo G3 como parâmetro de avaliação sobre a espessura da epiderme e da camada córnea do biomodelo *Macaca mulatta*.

	PA EP	PA CO	CE EP	CE CO	TORIM EP	TORIM CO	TORES EP	TORES CO	SA EP	SA CO	VE EP	VE CO
P -valor	0,1578	0,8197	0,3694	0,6972	0,5253	0,872	0,6601	0,4586	0,6328	0,1215	0,7553	0,6379

PA: região parietal superior medial; CE: região cervical posterior; TORIM: região torácica intermamária; TORES: região torácica interescapular; SA: região sacral; VE: região ventral quadrante inferior esquerdo; EP: epiderme; CO: camada córnea da epiderme.

Quadro 10: Influência da umidade relativa referente ao dia do óbito dos animais do grupo G3 como parâmetro de avaliação sobre a espessura da epiderme e da camada córnea do biomodelo *Macaca mulatta*.

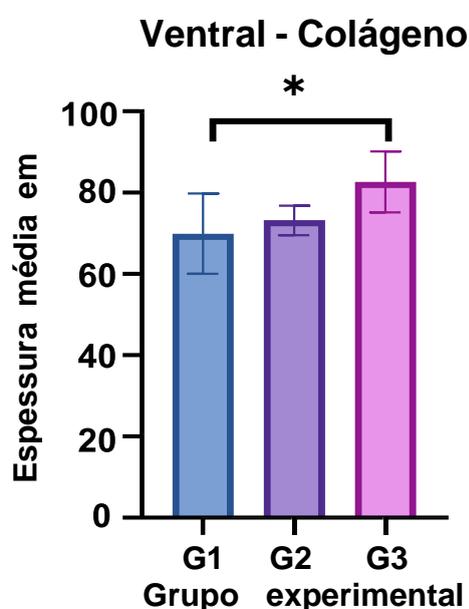
	PA EP	PA CO	CE EP	CE CO	TORIM EP	TORIM CO	TORES EP	TORES CO	SA EP	SA CO	VE EP	VE CO
P-valor	0.6417	0.1608	0.1793	0.4307	0.6477	0.1168	0.5912	0.1230	0.6160	0.4960	0.4779	0.4191

PA: região parietal superior medial; CE: região cervical posterior; TORIM: região torácica intermamária; TORES: região torácica interescapular; SA: região sacral; VE: região ventral quadrante inferior esquerdo; EP: epiderme; CO: camada córnea da epiderme.

6.2.5.4 Percentual de colágeno dérmico

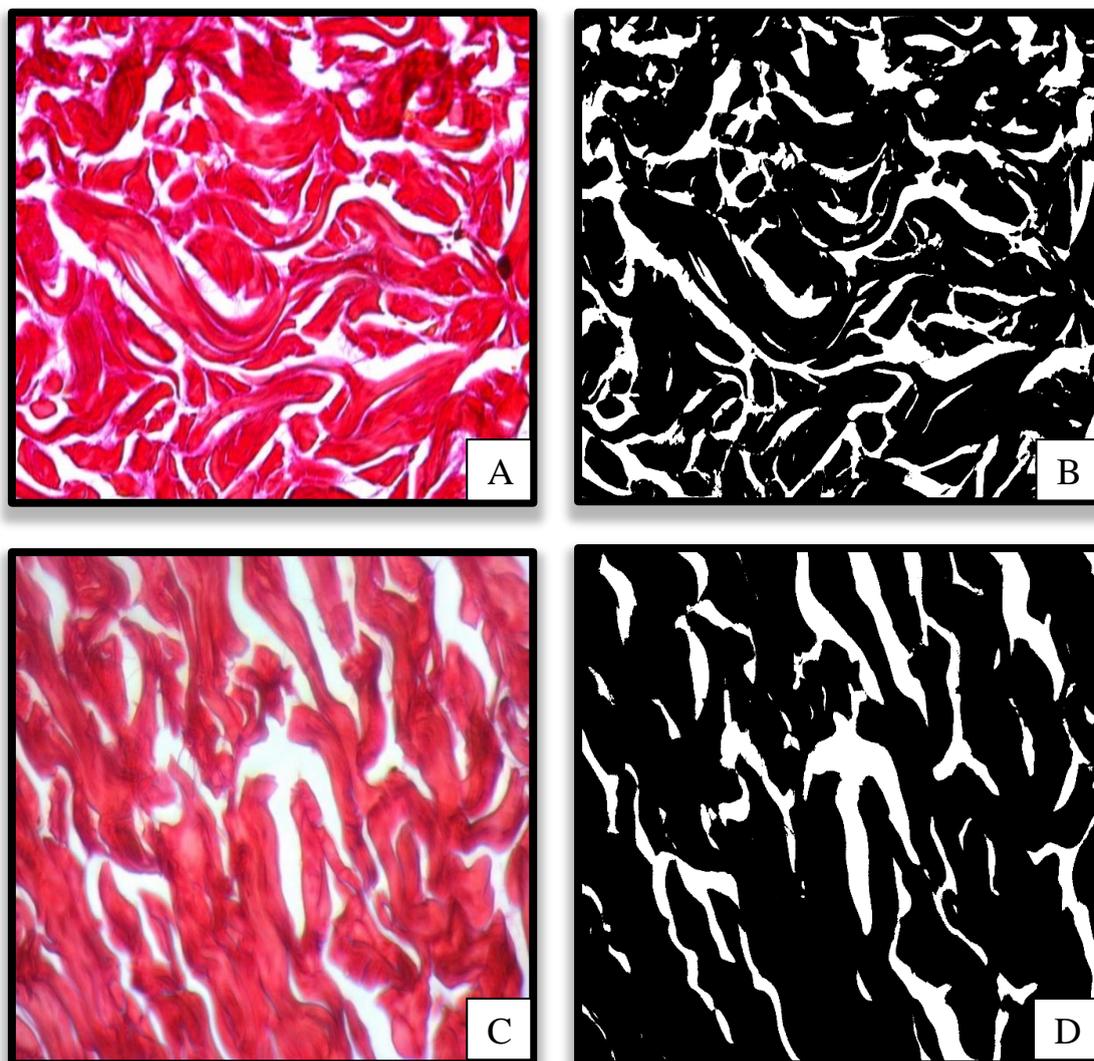
Em relação à avaliação do percentual do total de colágeno presente na derme, apenas a região ventral apresentou diferença estatisticamente significativa ($P=0,02$), conforme evidenciado na tabela (Tabela 11, Figura 24), no pós-teste observou-se que a diferença foi significativa entre os grupos G1 e G3 ($P=0,01$).

Figura 35: Percentual de colágeno dérmico presente da região ventral quadrante inferior esquerdo do biomodelo *Macaca mulatta*.



Grupos G1 e G3: $P: 0,0171$ * $P<0,05$.

Figura 36: Fotomicrografia representativa do percentual de colágeno dérmico presente na região ventral quadrante inferior esquerdo.



Imagens de microscopia óptica (Picrosirius Red, Obj de 40X) da região ventral quadrante inferior esquerdo de *Macaca mulatta* . A e B (grupo G1) – Marcação do colágeno dérmico presente no tecido através do método de coloração Picrosirius Red, demonstrando as fibras colágenas coradas intensamente em vermelho. C e D (grupo G3) – Quantificação do colágeno total observado na imagem em tom escuro através do programa ImageJ .

Tabela 11: Média e desvio padrão da média do percentual de colágeno presente na derme da espécie *Macaca mulatta*.

Região Anatômica	G1 (Média e Desvp)	G2 (Média e Desvp)	G3 (Média e Desvp)	P-Valor
Parietal	67,13 ± 6,17	71,14 ± 9,01	80,62 ± 8,92	0,0628
Cervical	73,47 ± 15,56	71,22 ± 5,1	81,09 ± 5,15	0,1708
Torácica Intermamária	75,91 ± 5,98	70,87 ± 7,98	74,75 ± 3,83	0,3469
Torácica Interescapular	69,9 ± 4,03	74,32 ± 7,72	75,45 ± 3,38	0,2815
Sacral	71,44 ± 5,83	78,43 ± 9,16	71,69 ± 5,73	0,1713
Ventral	69,89 ± 9,87	73,17 ± 3,65	82,65 ± 7,5	0,0176

G1: grupo controle - animais frescos; G2: grupo experimental - animais submetidos à eutanásia e imediatamente congelados; G3: grupo experimental - animais encontrados mortos no recinto e posteriormente congelados

Nota: Houve diferença significativa entre os grupos G1 e G3 (P-valor 0,0171) *P<0,05.

6.2.5.5 Influência da temperatura e umidade no colágeno dérmico

Foi avaliada a influência da temperatura e umidade no percentual de colágeno dérmico (Quadros 11 e 12) nas diferentes regiões no G3, onde as carcaças ficaram expostas às condições ambientais no momento anterior à coleta do material. Para tanto, foi utilizada a análise de regressão simples.

Quadro 11: Influência da temperatura no dia do óbito dos animais do G3 como parâmetro de avaliação quanto ao percentual de colágeno dérmico no biomodelo *Macaca mulatta*.

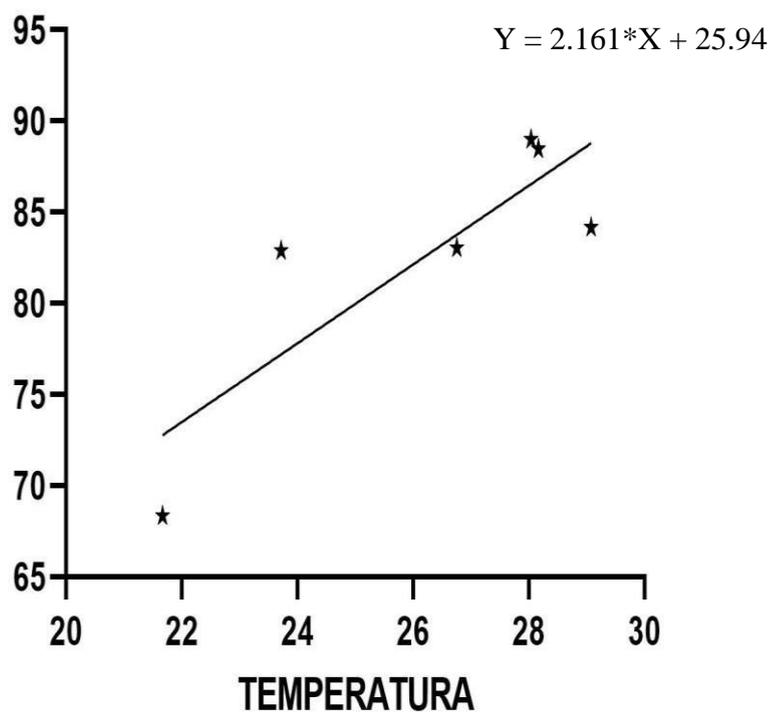
	PARIETAL	CERVICAL	TORÁCICA INTERMAMÁRIA	TORÁCICA INTERESCAPULAR	SACRAL	VENTRAL
P -valor	0,4838	0,4678	0,4152	0,4152	0,5253	0,0362

Quadro 12: Influência da umidade no dia do óbito dos animais do grupo G3 como parâmetro de avaliação quanto ao percentual de colágeno dérmico do biomodelo *Macaca mulatta*.

	PARIETAL	CERVICAL	TORÁCICA INTERMAMÁRIA	TORÁCICA INTERESCAPULAR	SACRAL	VENTRAL
P -valor	0,0148	0,5787	0,0905	0,2692	0,8102	0,3153

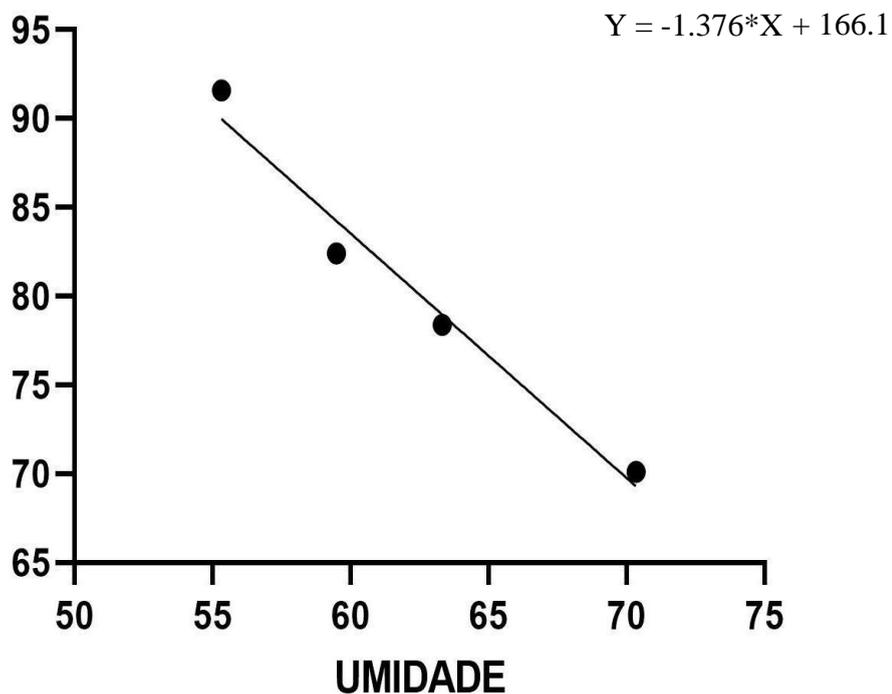
Houve relação significativa da temperatura para a região ventral ($P < 0,05$; $Y = 2.161 * X + 25.94$) (Figura 25) e da umidade para a região cervical ($P < 0,05$; $Y = -1.376 * X + 166.1$) (Figura 26).

Figura 37: Relação da temperatura e da quantificação do percentual de colágeno presente da derme da região ventral do biomodelo *Macaca mulatta*.



Nota: (P: 0,0362); $P < 0,05$.

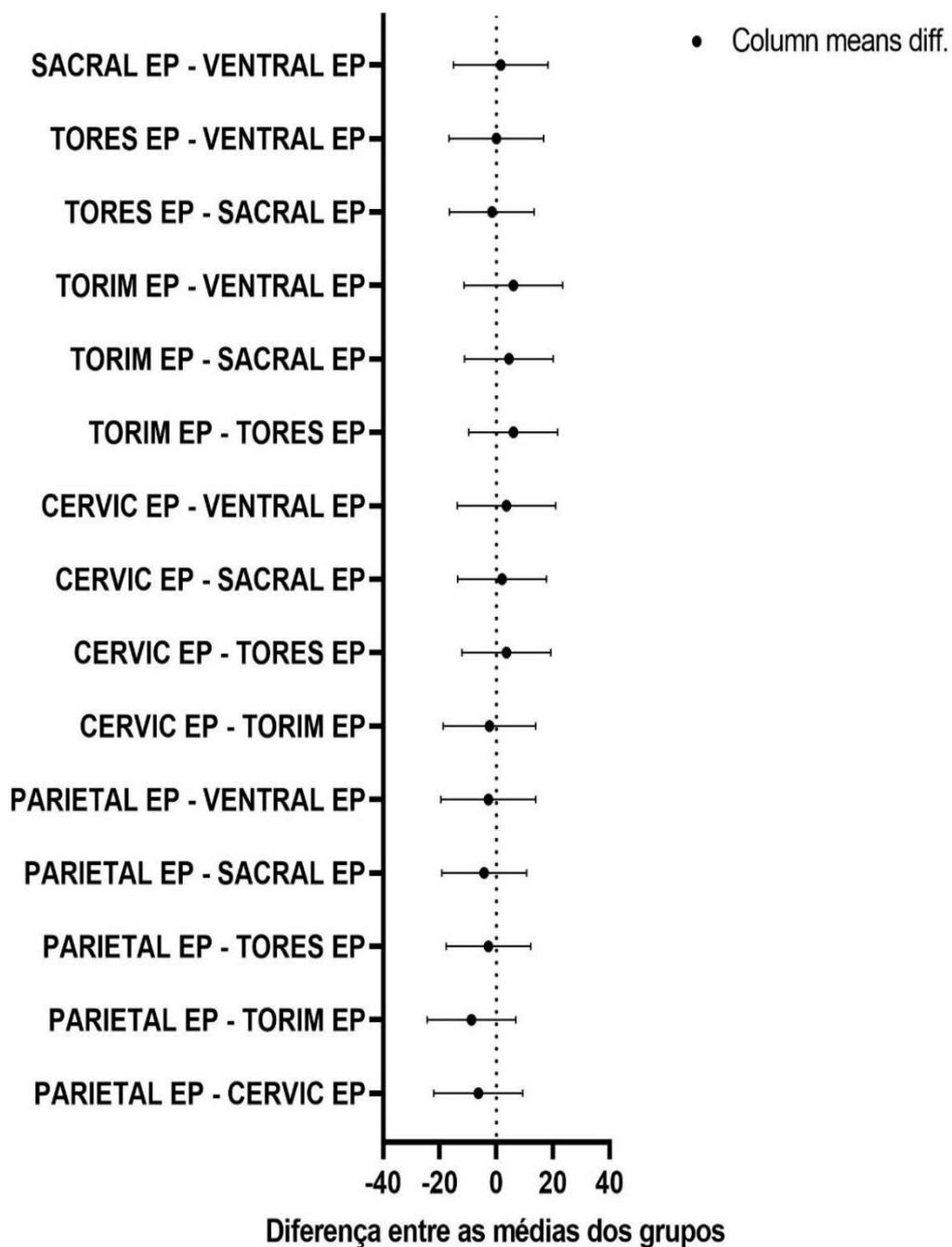
Figura 38: Relação da umidade e da quantificação do percentual de colágeno presente da derme da região cervical do biomodelo *Macaca mulatta*.



Nota: (P: 0,0148); $P < 0,05$.

Ainda, foi avaliada a espessura da epiderme (Figura 27) e da camada córnea (Figura 28) e entre as diferentes regiões através do teste de Tukey. Na análise não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as regiões ($P=0,8551$ e $P=0,0397$).

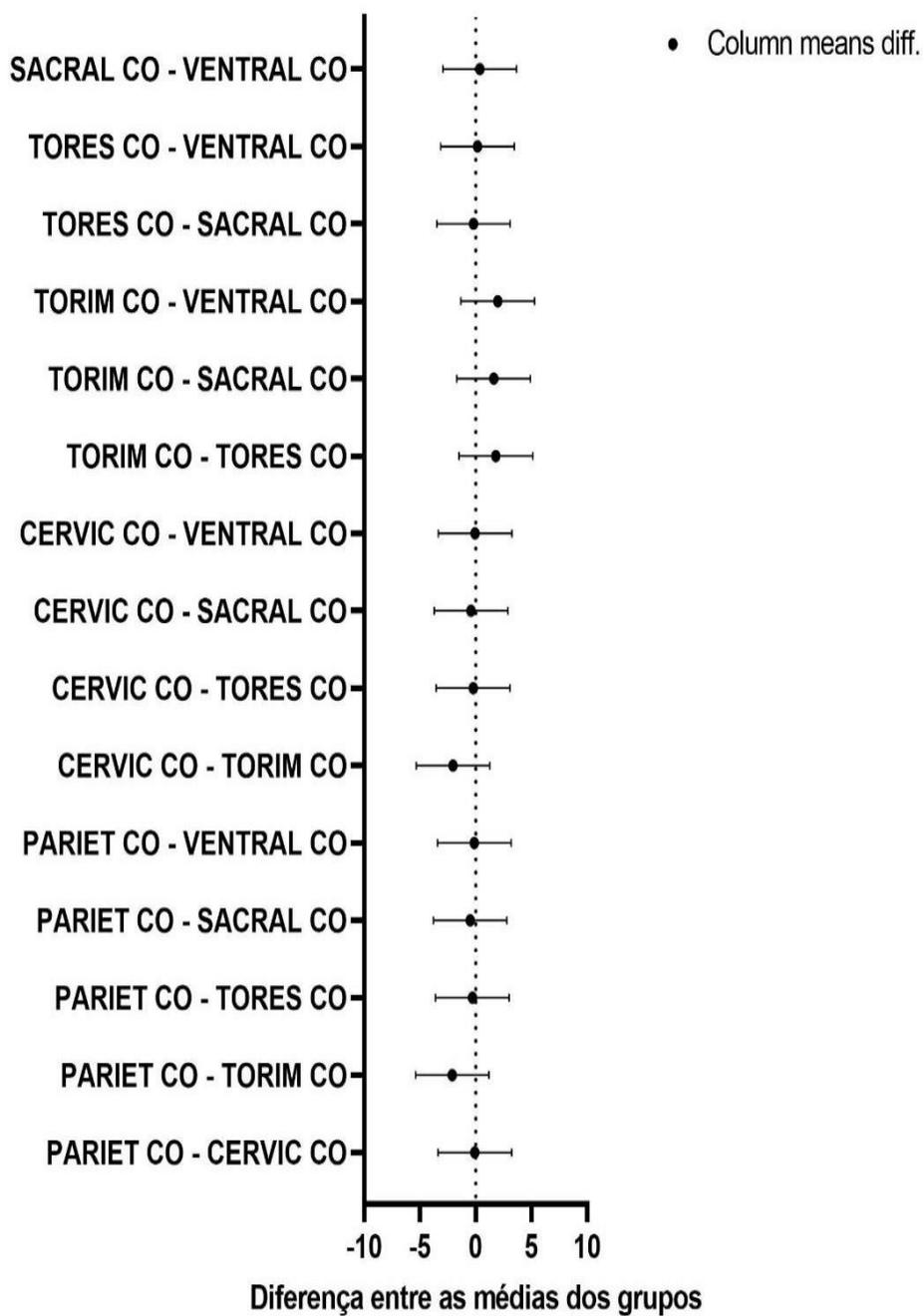
Figura 39: Relação entre a espessura da epiderme e as diferentes regiões anatômicas no biomodelo *Macaca mulatta* – (5% Confidence Intervals (Tukey)).



EP: Epiderme.

Nota: Não houve diferença significativa entre as regiões. $P < 0,05$.

Figura 40: Relação entre a espessura da camada córnea e as diferentes regiões anatômicas no biomodelo *Macaca mulatta* – Confidence Intervals (Tukey).



CO: camada córnea da epiderme.

Nota: Não houve diferença significativa. $P < 0,05$

7. DISCUSSÃO

7.1 Achados histológicos da pele de *Macaca mulatta* (Macaco rhesus)

É surpreendente a raridade de literatura referente à pele do macaco rhesus mediante o seu amplo uso científico.

Em relação a epiderme, nos macacos rhesus, regiões sem pelos possuem raras subestruturas e o que se observa é um sistema de cristas epidérmicas na porção inferior da epiderme e nas superfícies de fricção (MONTAGNA; YUN; MACHIDA, 1964; CUMMINS; MIDLOW; 1961), fato observado nas regiões palmar e plantar neste estudo. Nestas regiões, também foi possível constatar por grânulos de melanina em células do estrato basal, bem como um espesso estrato córneo.

Na literatura tem sido relatado que a maior parte da pele dos macacos rhesus possui a epiderme moderadamente grossa, tendo a camada de malpighi três ou mais camadas de células, um estrato granuloso que é frequentemente descontínuo, e um estrato córneo compacto. O estrato granulomatoso está bem desenvolvido nas superfícies de fricção e nas calosidades isquiáticas, sendo compostas por células que contêm populações densas de grânulos de querato-hialina. Aqui, foi possível observar uma epiderme relativamente fina nas regiões de pele pilosa, apresentando cerca de 2-3 camadas de células no estrato espinhoso, presença de glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas, além de folículos pilosos bem distribuídos, principalmente na região parietal superior medial. Ainda, em regiões de pele glabra (sem pelos) observou-se uma vasta camada córnea e presença de 8 ou mais camadas de células no estrato espinhoso.

Nas áreas desprovidas de pelos, encontradas nas regiões de calosidade isquiática, palmar e plantar, a epiderme é densamente queratinizada, podendo ter uma espessura de até 600 μm (WONG *et al.*, 2015; MIRAGLIA *et al.*, 1976).

As regiões das calosidades isquiáticas dos macacos do Velho Mundo são áreas de pele grossas, intimamente próximas aos ísquios, descritas como características adaptativas epiteliais dos Cercopithecoidea associadas à sua capacidade de sentar-se ereto (WASHBURN, 1957). Nas calosidades isquiáticas, a espessura da epiderme é caracterizada por possuir o estrato córneo denso e altamente cornificado (MONTAGNA; YUN; MACHIDA, 1964). Tais áreas proporcionam conforto e estabilidade ao sentar-se em galhos finos durante a alimentação, hábito de catação de pelos, descansar e locomover nos galhos de árvores (VILENSKY, 1978). Portanto, estas são regiões que sofrem atrito constante, justificando a presença de lesões

histopatológicas como as dermatites encontradas neste trabalho. Ainda, em símios do Novo Mundo *Saimiri sciureus*, já foi relatada a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, como causa de dermatite (LAUSEN *et al.*, 1986; LANGNER; BRIGHTMAN; TRANQUILLI, 1986) porém, no presente estudo não foram encontradas áreas de lesões macroscópicas que pudessem indicar infecções bacterianas nos calos isquiáticos analisados.

7.2 Avaliação da viabilidade das amostras para inclusão no estudo

Durante a análise e rastreio das amostras, quadros de dermatite superficial foram observados nos animais mesmo sem alteração macroscópica evidente. A dermatite foi mais frequente nas regiões Palmar (20,00%), Plantar (26,31%) e Calosidade Isquiática (17,65%).

A presença de alterações histológicas compatíveis com dermatite em animais sem quadro clínico equivalente é desconhecida em PNH, assim como sobre as dermatoses em geral devido à escassez de dados sobre o assunto, tanto sobre animais de vida livre quanto de cativeiro (BERNSTEIN; DIDIER, 2009). Das regiões onde foi observada a dermatite, as calosidades isquiáticas dos macacos do Velho Mundo são áreas de pele grossa próxima aos ísquios e descritas como características adaptativas associadas à capacidade de sentar-se ereto (WASHBURN, 1957) proporcionando conforto e estabilidade ao sentar-se (VILENSKY, 1978) e permiti que os animais consigam adormecer por algum tempo sentados. Especialização cutânea característica do gênero *Macaca* e dos grandes símios (bonobos, gorilas, chimpanzés e orangotangos) (WASHBURN, 1957).

Portanto, as calosidades isquiáticas assim como as regiões plantares e palmares são estruturas que sofrem atrito constante, o que pode estar relacionado à maior ocorrência de dermatite nestas regiões. É importante destacar que, apesar da sua importância biológica, a calosidade isquiática não tem recebido muita atenção na medicina veterinária e, por essa razão, existem poucas descrições de patologia nesta região (LIU *et al.*, 2012).

Ainda, além do atrito, em PNH diversos agentes podem estar relacionados a dermatites, incluindo agentes irritantes, queimaduras, alérgenos, trauma e infecções bacterianas, parasitárias ou micóticas, associadas ou não à uma doença intercorrente interna ou sistêmica. Em macacos rhesus essa lesão ocorre mais comumente em idosos e possui como principais achados: áreas de eritema, lesões exsudativas, pregueamento, diminuição da espessura dos pelos e ocorrência de calosidades nas regiões plantares e palmares. (LOPES *et al.*, 2010).

Porém, nos animais deste estudo não foram observadas alterações macroscópicas, uma vez que a inflamação presente era leve e sem maiores comprometimentos teciduais, diferente dos casos em que há manifestação clínica do quadro.

7.3 O impacto da congelação na preservação de amostras para estudo macro e microscópico da pele de *Macaca mulatta*

Neste estudo foram avaliados os impactos do processo de congelação na preservação das carcaças tanto sob o ponto de vista macro quanto microscópico do sistema tegumentar.

7.3.1. Macroscopia

Sob o ponto de vista macroscópico, os achados demonstraram a importância, da coleta imediata e do processo de congelamento para a preservação adequada das amostras, visto que, no grupo G3, 50% dos animais apresentaram pseudomelanose e *livor mortis*, alterações não observadas em nenhum dos animais dos demais grupos. Como discutido no tópico anterior sobre viabilidade das amostras, as condições ambientais podem interferir na velocidade do processo de decomposição após o óbito (KOMAR, 1998; MANN *et al.*, 1990; CAMPOBASSO *et al.*, 2001; WAGNER, 2017; GARCÊS; PIRES, 2020). O grupo G3 permaneceu exposto a fatores ambientais adversos até a congelação por ser formado por animais encontrados mortos no recinto.

Em relação à pseudomelanose, a flora corporal, incluindo as bactérias presentes no trato gastrointestinal, multiplicam-se rapidamente após o óbito e produzem gás pelo metabolismo bacteriano, iniciando o processo de putrefação. As manchas de coloração esverdeada presentes na pseudomelanose são resultado da reação entre gases produzidos por bactérias, mais especificamente o sulfeto de hidrogênio e o ferro presente na hemoglobina local, originada da hemólise pós morte, produzindo a sulfametahemoglobina (GARCÊS; PIRES, 2020). Essas manchas podem ser encontradas na parede abdominal e nas serosas intestinais, podendo algumas vezes apresentar coloração mais enegrecida. Essa alteração é considerada como o primeiro estágio de putrefação (BANDARRA; SEQUEIRA, 1999).

Já em relação ao *livor mortis* (congestão cadavérica ou hipostática), este processo é resultado do depósito de sangue nas regiões mais baixas do cadáver em razão da gravidade, e perda do tônus vascular, resultando em acúmulos de coágulos nos vasos e que tendem a se fixar

nos lugares onde se formam, desenvolvendo a tonalidade vermelha arroxeadada típica nestes achados de necropsia (MCGAVIN; ZACHARY, 2013; GARCÊS; PIRES, 2020). A descrição sobre o tempo de aparecimento do processo varia, iniciando-se cerca de 1 hora após o óbito e a fixação dos coágulos se dá cerca de 12-24 horas depois (MCGAVIN; ZACHARY, 2013). Para animais silvestres, tal processo ocorre entre 30 minutos a 4 horas após o óbito e se manifesta intensamente 8 a 12 horas após (GARCÊS; PIRES, 2020).

Como mencionado anteriormente, as carcaças do G3 permaneceram mais tempo em temperatura ambiente até serem submetidas ao congelamento, sendo este procedimento é comum em muitos criatórios de PNH, pois, muitas das vezes, os animais são encontrados mortos pela manhã e encaminhados para a realização da necropsia sem informação ao certo de quanto tempo ocorreu o óbito. No entanto, o processo de congelamento precoce foi capaz tanto de preservar as carcaças do grupo G3, desacelerando ou mesmo de forma a impedir a continuação do processo após a pseudomelanose e *livor mortis*, como também foi capaz de proteger as carcaças do grupo precocemente preservado por esta técnica (grupo G2) das alterações observadas no G3. Apesar de não terem sido encontradas alterações *post mortem* no grupo G2, o aspecto geral da carcaça apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao G1 (controle), mas, mesmo assim, manteve com escore médio 2, considerado bom, de aspecto geral da carcaça, possibilitando o exame necroscópico.

Estes achados são importantes, pois abrangem aspectos de uma realidade comum em muitos criatórios de PNH, principalmente nos que não há um médico veterinário 24 horas disponível para realização imediata da necropsia após o óbito. Isto reforça a importância da necropsia imediata, seu rápido congelamento após o óbito ou, na impossibilidade da realização destes procedimentos, o amplo conhecimento das alterações cadavéricas pelo profissional envolvido com o exame macroscópico de forma a evitar erros durante o exame (BANDARRA; SEQUEIRA, 1999) e auxiliar na determinação da viabilidade dos tecidos para submissão a avaliação histopatológica.

7.3.2. Microscopia

Com relação aos parâmetros microscópicos avaliados, a camada córnea estava preservada em todos as regiões, independente do grupo, com 75% ou mais dos animais apresentando compactação da mesma, com exceção das regiões parietal superior medial no grupo G3 e ventral no grupo G1, onde metade dos animais apresentaram presença de destacamento da camada córnea. Apesar disso, não houve diferença quanto a extensão do destacamento entre os

grupos avaliados.

Também não houve diferença estatisticamente significativa para o grau de condensação basofílica e para o grau de perda da morfologia da camada basal.

O único parâmetro com alteração significativa foi quanto ao grau de degeneração hidrópica, onde foi possível notar uma diferença significativa na região ventral, tanto entre os grupos G1 e G2, quanto entre os grupos G1 e G3, ocorrendo tanto na metade superior quanto em regiões mais próximas à camada basal, independente do grupo estudado.

Em nenhuma das carcaças estudadas foi observada presença ou vestígios de insetos e, nas condições estudadas, nem o tempo de exposição a temperatura ambiente (G3) e nem o congelamento (G2) influenciaram na presença da camada córnea, no grau de condensação basofílica e na preservação da morfologia da camada basal, mesmo com a descrição da importância dos fatores ambientais, incluindo temperatura, umidade e atividade dos insetos na decomposição cutânea (MANN *et al.*, 1990).

Em relação à camada córnea, por ser formada por muitas camadas de queratócitos, células ricas em queratina, uma proteína fibrosa intercelular responsável pela resistência da epiderme e pela formação de uma barreira protetora (HARGIS; GINN, 2013), esta característica provavelmente foi a responsável pela preservação da mesma, além do fato da própria técnica utilizada para coleta preservar as porções da pele, onde a epiderme costuma manter-se preservada (MEHREGAN; PINKUS, 1966). Contudo, em alguns casos, inclusive no grupo controle, houve animais apresentando perda da compactação, que provavelmente se deu ao fato de ser comum a utilização da tricotomia para examinar a pele para retirada do excesso de pelos, procedimento também realizados no estudo, onde o uso da lâmina de bisturi e da máquina tosadora pode ter comprometido a estrutura da camada córnea, já que nenhum outro efeito mais grave foi observado na camada.

A morte do animal resulta em morte de todas as células que compõem o seu organismo (autólise *post mortem*) e, até o presente momento, estudos em relação a estas alterações *post mortem* para determinação do tempo de óbito ainda são escassos em medicina humana (BARDALE *et al.*, 2012; CALDERÓN GARCIDUEÑAS *et al.*, 2016) e mais raros ainda em PNH. Esta escassez é preocupante, visto que essas informações colaboram no processo de investigação durante a necropsia e ajudam a distinguir entre uma patologia real e um artefato *post mortem* (DOUKAS *et al.*, 2000). Apesar da importância do tema, alguns poucos artigos são encontrados como o de Kovarik e colaboradores (2005), onde realizaram um estudo macro e microscópico *post mortem* cutâneo para avaliar as alterações na primeira semana *post mortem*. Neste estudo os autores não observaram alterações macroscópicas até uma semana após o óbito,

e microscopicamente três alterações histológicas principais foram observadas nas amostras: separação dermoepidérmica focal (sem momento definido para seu aparecimento), a necrose do ducto écrino (após o 4º dia) e a degeneração dérmica (após o 2º dia). No entanto, não houve correlação com os achados deste estudo.

Em um outro estudo, realizado por Bardale e colaboradores (2012), foram avaliadas as alterações histológicas na pele de 30 cadáveres humanos, onde observaram que após nove a 12 horas de morte, as células basais da epiderme começaram a se deformar e a superfície e a derme estava parcialmente separada. Após 12–18 horas de morte, a epiderme e a derme foram separadas. As células das glândulas sudoríparas sofreram degeneração vacuolar quatro horas após a morte, cuja ocorrência aumentava com intervalo pós-óbito.

Calderón-Garcidueñas e colaboradores (2016) avaliaram a utilidade do exame histopatológico da pele como um método complementar para determinar o intervalo *post mortem*. Dos critérios microscópicos avaliados os seguintes também foram utilizados neste estudo: i) presença de estrato córneo; ii) compactação do estrato córneo; iii) porcentagem de descolamento do estrato córneo; iv) condensação basofílica; v) topografia da degeneração da camada espinhosa; vi) porcentagem de degeneração hidrópica precoce da camada espinhosa; vii) porcentagem de perda de morfologia da camada de células basais. Destes, os que foram selecionados neste estudo foram: presença da camada córnea, topografia da degeneração hidrópica da camada espinhosa, além da porcentagem de degeneração hidrópica e perda da morfologia da camada basal. No estudo dos autores citados, apenas os seguintes itens apresentaram correlação estatística com o tempo *post mortem*: camada de células da córnea, topografia da degeneração hidrópica da camada espinhosa e porcentagem de degeneração hidrópica e perda da morfologia da camada basal. Dos achados descritos neste estudo, apenas a degeneração hidrópica foi o achado com diferença estatisticamente significativa entre os grupos, seja ele do grupo G3, ou do grupo G2, apenas na região ventral. Porém, nestes dois grupos, houve uma redução significativa no grau de degeneração hidrópica encontrada no grupo controle. Ao comparar a degeneração hidrópica neste grupo com a condensação basofílica através da análise de regressão linear, observou-se uma tendência de correlação entre estes dois parâmetros ($P=0,052$) e, provavelmente, uma menor degeneração hidrópica ocorreu, pois já havia um grau mais elevado de condensação basofílica tecidual.

Mais recentemente, Wei e colaboradores (2020) relataram alterações histológicas *post mortem* na pele humana até 32 dias após o óbito. O referido relato, assim como no presente estudo, os pesquisadores não observaram alterações óbvias na camada epidérmica no momento de morte (e no caso do referido estudo nem nas primeiras 24 horas). Porém, a picnose nuclear

já podia ser observada após 24 horas. Esta diferença em relação ao estudo provavelmente se deve ao fato de, neste estudo, ter sido documentada a condensação basofílica mesmo sem a retração nuclear (picnose), abordando, portanto, um período anterior ao observado por Weie sua equipe.

Um outro parâmetro avaliado neste estudo foi a espessura da epiderme e da camada córnea em rhesus, assim como o impacto da congelação sob estes parâmetros. Com relação à histomorfometria da epiderme, foi possível observar apenas diferença significativa na região sacral da pele do grupo G1 em relação ao G2 com a epiderme significativamente menor. Já com relação à espessura considerando apenas a camada córnea, só houve diferença significativa na região cervical tanto entre os grupos G1 e G2 quanto entre os grupos G1 e G3 ($P= 0,009$), onde também observou-se redução nesta camada em relação ao grupo controle. Foi avaliado também o percentual de marcação paracolágeno na derme dos animais. Sobre este parâmetro, apenas a região ventral apresentou diferença estatisticamente significativa e apenas entre os grupos G1 e G3 onde ocorreu Obj da marcação do colágeno dérmico.

Vale enfatizar que este é o primeiro estudo a analisar estes parâmetros em macacos rhesus, inclusive para avaliação da influência da congelação que será discutida no próximo tópico.

8.2.3.3 Efeitos da técnica de conservação da pele por congelação

Apesar do conhecimento do impacto da congelação sobre o tecido, este processo tem sido utilizado rotineiramente para preservação de carcaças de animais antes do exame necroscópico, da mesma forma a pele tem sido comumente congelada a fim de preservar as propriedades mecânicas sem induzir decomposição biológica e mudanças estruturais (GEERLIGS, 2006).

Neste estudo observou-se, como já relatado anteriormente, que o processo de congelamento foi capaz tanto de preservar as carcaças do grupo G3, desacelerando o processo de putrefação, de forma impedir a continuação do processo após a pseudomelanose e *algor mortis*. Além disso, o congelamento foi capaz de proteger as carcaças do grupo precocemente preservado por esta técnica (grupo G2) das alterações observadas no grupo G3. Observou-se também que apesar de não terem sido encontradas alterações *post mortem* no grupo G2, o aspecto geral da carcaça apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, mas, mesmo assim, manteve com score médio 2, considerado bom, de aspecto geral da carcaça, possibilitando o exame necroscópico.

Destaca-se que, para os achados histológicos, na maioria das regiões avaliadas não houve alteração do sistema tegumentar em relação nem mesmo no grupo G3, indicando a possibilidade de coleta das amostras deste sistema mesmo 24 horas após o óbito, nas regiões devendo-se evitar as regiões ventral, e cervical. Sugere-se também evitar as regiões palmar, plantar e das calosidades isquiáticas pela possibilidade de dermatite local mesmo sem evidência clínica.

No entanto, o processo de congelamento preservou adequadamente as amostras sob o ponto de vista macroscópico, e certamente pode auxiliar na avaliação do estado de conservação nos tecidos adjacentes. A congelamento impactou positivamente na preservação da região ventral quanto a degeneração hidrópica e ao colágeno dérmico. Em contrapartida, o processo não preservou as características das regiões sacral e cervical, devendo estas regiões serem evitadas como potencial área de coleta, assim como as regiões palmar, plantar e das calosidades isquiáticas pelos motivos já anteriormente citados.

Portanto, de modo geral, este estudo sugere que apesar da coleta de amostras de animais encontrados mortos no recito a menos de 24 horas ser viável em estudos do sistema tegumentar para algumas regiões cutâneas, o processo de congelamento é de grande importância para preservação do tegumento, bem como a possível preservação de demais sistemas. O aproveitamento de carcaças, desta forma, é um processo viável para estudos sobre morfologia cutânea e deve ser implementado ao máximo no criatório de PNH em consonância ao princípio proposto por Russel e Burch (1959), proporcionando, assim, o refinamento e a redução do uso de animais de laboratório (IPSC, 1980).

8. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram concluir que na espécie símia *Macaca mulatta*:

- O processo de congelamento é capaz de preservar carcaças conservadas em temperatura ambiente em até 24 horas, desacelerando o processo de putrefação, de forma a impedir a continuação do processo após a pseudomelanose e *livor mortis*.
- Apesar da congelação poder ocasionar artefatos devido aos cristais de gelo, esta técnica demonstrou ser eficaz na preservação das estruturas teciduais cutêneas em carcaças precocemente preservadas.
- Alterações *post mortem* evidenciadas em carcaças frescas submetidas ao processo de congelamento apresentam aspecto geral de conservação considerado bom (score 2), possibilitando a execução do exame necroscópico.
- É possível coletar amostras do sistema tegumentar no período de até 24 horas *post mortem*, devendo-se, entretanto, evitar as regiões ventral e cervical devido a alterações significativas que ocorrem nesta situação de coleta.
- As regiões palmar, plantar e das calosidades isquiáticas devem ser evitadas para estudos de morfologia devido à possibilidade de dermatite local mesmo sem evidência clínica.
- O processo de congelação é capaz de preservar adequadamente as amostras de tecido cutâneo sob o ponto de vista macroscópico, auxiliando nos casos em que outros tecidos necessitem ser também coletados e não seja possível a coleta do material fresco.
- O processo de congelamento impacta positivamente na preservação da região ventral quanto à degeneração hidrópica e ao colágeno dérmico. No entanto, o processo de congelamento não preserva as características das regiões sacral e cervical, devendo estas serem evitadas como potencial área de coleta.

9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA DISSERTAÇÃO

9.1 Resumo apresentado em evento científico

DEMARQUE, K. C.; MOURA, T. M.; RIBEIRO, M. J. B.; SOUZA, I. V.; ANDRADE, M. C.; LOPES, C. A. A. **Estudo histológico dos espécimes *Macaca mulatta* e *Saimiri sciureus*: estado da arte com enfoque no sistema tegumentar.** In: XXIII Congresso Brasileiro de Primatologia, 2019 Teresópolis – RJ.

9.2 Resumo publicado em revista científica

MOURA, M. M.; RIBEIRO, M. J. B.; SOUZA, I. V.; ANDRADE, M. C.; NASCIMENTO, J. S.; DEMARQUE, K. C.; LOPES, C. A. A. **Aspectos morfométricos da congelação nos parâmetros microscópicos do sistema tegumentar do macaco rhesus (*Macaca mulatta*).** In: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), 2019. São Paulo – SP

9. REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, A. B.; BOER, H.; GOTTLIEB, G. J. **Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases: an algorithmic method based on pattern analysis**. 3 ed. New York, NY: Histopathology, 2005.
- ANDERSON, G. S. Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). **J Forensic Sci**, 2000; 45(4): 824-832.
- ANDRADE, M. C. R. *et al.* **Biologic data of *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, and *Saimiri sciureus* used for research at the Fiocruz primate center**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 99 (6), Rio de Janeiro, p. 581-589, 2004.
- ANDRADE, A.; ANDRADE, M. C. R. **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas não Humanos na Pesquisa Biomédica**. Rio de Janeiro, RJ: Fiocruz, 2010
- AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo, SP: Terra Brasilis, 1995.
- BACHA, W. J.; BACHA, L. M. Tegumento In: **Atlas Colorido de Histologia Veterinária**. São Paulo, SP: Roca, 2003.
- BANDARRA, E. P.; SEQUEIRA, J. L. Tanatologia: fenômenos cadavéricos transformativos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 2, n. 3, p. 72–76, 1999.
- BARDALE, R. V. *et al.* Evaluation of histologic changes of the skin in postmortem period. **American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 33, n. 4, p. 357– 361, 2012.
- BERNSTEIN, J. A.; DIDIER, P. J. Nonhuman primate dermatology: a literature review. **Veterinary Dermatology**, 2009. V 20 (3), 145-156. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00742.x.
- BENTLEY, J. P. 1970. The biological role of the ground substance mucopolysaccharides. *Advan. Biol. Skin* 10:103-121 Apud in: MONTAGNA, W. **The skin of nonhuman primates**. Integrative and Comparative Biology, v. 12, n. 1, p. 109–124, 1972.
- BIELITZKI, J. A. K. AND J. **Integumentary System Diseases of Nonhuman Primates In: Nonhuman Primates in Biomedical Research**. Elsevier Inc. p. 563- 587, 2012.
- BOINSKI S, JACK K, LAMARSH C, C. J. **Squirrel monkeys in Costa Rica: drifting to extinction**. Oryx, 1998.
- BRASIL. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 1: introdução geral**. Brasília, CONCEA, 2015.
- BROOKS, J. W. Postmortem Changes in Animal Carcasses and Estimation of the Postmortem Interval. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 5, p. 929–940, 2016

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, A. L.; SANTIESTEBAN, G. M.; DENIS-RODRÍGUEZ, E.; FLORES, R. M. C.; DENIS-RODRÍGUEZ, P. B. **Estudio forense de los cambios post mortem en la piel como prueba complementaria para determinar el intervalo post mortem (primeras 78 horas)**. Colomb forense [Internet]. 20 de octubre de 2016 ;3(2):27-3. Disponível em: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/ml/article/view/1739>

CAMPOBASSO, C. P.; INTRONA, F. **The forensic entomologist in the context of the forensic pathologist's role**. Forensic Science International, n. 120, p. 132–139, 2001.

CAMPOBASSO, C.P. et al. **Factors affecting decomposition and Diptera colonization**. Forensic Science International, v. 120, p. 18–27, 2001.

CAPITANIO, J. P. Personality dimensions in adult male Rhesus Macaques: Prediction of behaviors across time and situation. **American Journal of Primatology**, n. 47, p. 299–320, 1999.

CAWTHON LANG, K. A. **Primate Factsheets: Rhesus macaque (Macaca mulatta) Taxonomy, Morphology & Ecology**. Disponível em: <<https://primate.wisc.edu/primate-info-net/>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

CAWTHON LANG KA. **Primate Factsheets: Long-tailed macaque (Macaca fascicularis) Taxonomy, Morphology, & Ecology**. Disponível em: <http://pin.primare.wisc.edu/factsheets/entry/long-tailed_macaque>. Acesso em: 5 mar. 2020.

COHEN BJ, L. F. **Medicina de Animais de Laboratório: Perspectivas Históricas em Medicina de Animais de Laboratório**. Orlando, Flórida: Academic Press, p. 1–17, 1984.

CUMMINS, H.; MIDLOW, C. **Finger Prints, Palms and Soles. An Introduction to Dermatoglyphics**. Dover, New York.

DETTMEYER, R. B. **Forensi Histopathology. Fundamentals and Prerspectves**. New York: Springer 2011

DEMARQUE, C., MOURA, T. M., RIBEIRO, M. J. B.; SOUZA, I. V.; ANDRADE, M. C. LOPPE, C. A. A. **Estudo histológico dos espécimes Macaca mulatta e Saimiri sciureus: estado da arte com enfoque no sistema tegumentar**. Rio de Janeiro, 2019.

DENIS-RODRÍGUEZ, E. *et al.* **Forensic study of skin postmortem changes as a supplementary test to determine post mortem interval (first 78 hours)**. Colombia Forense, v. 3, n. 2, p. 27–33, 2016.

DIMAIO, V. J. D.; DIMAIO. **Forensic Pathology**. 2. ed. Boca Raton London New York Washington, CRC Press, 2001.

DITTUS W. **Demography: a window to social evolution**. In: **Thierry B, Singh M, Kaumanns W. Macaque societies: a model for the study of social organization**. Cambridge, UK: Cambridge. p. 87-112, 2004.

DOUKAS, A. G.; BAMBERG, M.; GILLES, R.; EVANS, R.; KOLLIAS, N. **Spectroscopic determinations of skin viability: a predictor of postmortem interval**. J Forensic Sci. 2000;45(1):36-41.

- ELIAS, P. M. Structure and Function of the Stratum Corneum Extracellular Matrix. **Journal of Investigative Dermatology**, 2012. V. 132, p. 2131-2133. Doi: 1038/jid.2012.246.
- ELLIS, R. A.; MONTAGNA, W. The skin of primates. VI. The skin of the gorilla (*Gorilla gorilla*). *American Journal of Physical Anthropology*, 1962. 20(2), 79-93. doi:10.1002/ajpa.1330200210.
- ERLANDSSON, M. M. R. **Estimation of the post-mortem interval in beagle dogs**. *Sei Justice*, v. 47, n. 4, p. 150–154, 2007.
- EURLL, J. A.; FRAPPIER, B. L. **Integument. In: Eurell, J. A.; Frappier, B. L. Dellmann's textbook of veterinary histology**. 6. ed. Philadelphia: Blackwell Publishing. p. 320-346, 2006.
- FIEGUTH, A. et al. Influence of postmortem changes on immunohistochemical reactions in skin. **International Journal of Legal Medicine**, v. 110, n. 1, p. 18–21, 1997.
- FINCH, C. E.; AUSTAD, S. N. Primate aging in the mammalian scheme: The puzzle of extreme variation in brain aging. *Age*, v. 34, n. 5, p. 1075–1091, 2012.
- FOODEN, J. **Systematic review of the rhesus macaque, *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780)**. *Field Zool*, n. 96, p. 1–180, 2000.
- FRANÇA, G. V. **Medicina Legal**. 6. ed. São Paulo: Guanabara, 2001.
- FREEMAN, S. C; SONTALIA, S. Histology, Keratohyalin Granules, 2021 In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**. PMID: 30725734.
- GARCÊS, A.; PIRES, I. **Necropsy Techniques for Examining Wildlife Samples**. Bentham Books 2020. P. 23-42. DOI: 10.2174 / 97898114683391200101
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 3. ed. Elsevier 2007, p.338.
- GENESER, F. **histologia com bases moleculares**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 358, 356-357
- GEERLIGS, M. **A literature review of the mechanical behavior of the stratum corneum, the living epidermis and the subcutaneous fat tissue**. Technical Note PR-TN 450, 2006.
- GOLDSCHMIDT, B. *et al.* **Sexual dimorphism in the squirrel monkey, *Saimiri sciureus* (Linnaeus, 1758) and *Saimiri ustus* (I. Geoffroy, 1844) (Primates, Cebidae)**. *Braz J. Biol*, 2009. v. 69, p. 171–174.
- GRANT; PHILIP; HOFF, C. The skin primates. XLIV. Numerical taxonomy of primate skin. *American journal of physical anthropology*, v. 42, p. 66–151, 1975.
- GROVES. **International Commission on Zoological Nomenclature**, 2017. Disponível em: <<https://www.iczn.org/>>. Acesso em: 15 de maio 2020.
- GROVES, C. **Primate taxonomy**. Washington DC: Inst Smithsonian, 2001.

HADLER, W. A.; SILVEIRA, S. R. **Histofisiologia dos epitélios: correlação entre a morfologia e a função dos epitélios**. Campinas: UNICAMP. P. 13, 15, 1993.

HAM, A. W.; CORMACK, D. H. **Histologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.582-583, 1983

HARGIS, A. M.; GINN, P. E. O tegumento. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. (org.). **Bases da patologia em veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 1028-1030.

ITIS-NORTH AMERIC. **Integrated Taxonomic Information System**. Disponível em: <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=180099#null>. Acesso em: 19 de outubro, 2021.

KASTING, G.B.; BOWMAN, L.A. **Electrical analysis of fresh, excised human skin: a comparison with frozen skin**. Pharm Res. 1990, v.7(11):1141-6. doi: 10.1023/a:1015928225089. PMID: 2293212.

KRAMER, J. A.; BIELITZKI, J. **Integumentary System Diseases of Nonhuman Primates In: Nonhuman Primates in Biomedical Research: Diseases** Christian R. Abee, Keith Mansfield, ... Timothy Morris. Elsevier Inc, 2012 p. 563-587.

JUNQUEIRA; CARNEIRO. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara koogan, 2013.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular** uma Introdução à Patologia. 1ªed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier Science - Contents Direct, 2004.

KNIGT, B. **Forensic Pathology**. 2. ed. New York, NY: Orford University Press, 1996.

KÖHLER, W. **The mentality of apes**. In: LIVERIGHT (Ed.). New York, NY: Liveright, 1925.

KOMAR, D. A. Decay rates in a cold climate region: a review of cases involving advanced decomposition from the medical examiner's office in Edmonton, Alberta. **J Forensic Sci**, 1998, v. 43: p. 57–61.

KOVARIK, C.; STEWART, D.; COCKERELL, C. Gross and histologic postmortem changes of the skin. **American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, 2005, v. 26, n. 4, p. 305–308

LANGNER, P. H.; BRIGHTMAN, A. H.; TRANQUILLI, W. J. **Maxillofacial abscesses in captive squirrel monkeys**. J. Am. Vet. Med.Assoc., 1986, v. 189, p. 1218.

LEW, E. O.; MATSHES, E. Postmortem changes. In: Dolinak, D, Matshes, E. W.; Lew, E. O. **Postmortem changes**. New York, USA: Elsevier, 2005, p. 527-554, 2005.

LIU; GILBERT; WANG; DIDIER; VEAZEY. **Reactive amyloidosis associated with ischial callositis: a report with histology of ischial callosities in rhesus macaques (*Macaca mulatta*)**. J Vet Diagn Invest. 2012, 24 (6): p. 1184-1188. doi: 10.1177 / 1040638712463919

- LOPES, C. A. A.; FASANO, D. M., BRAVIN, J. S.; CYSNE, L. B.; ANDRADE, M.C. R.; TANNOUZ, V. G. S. Clínica Aplicada In: **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica** /. Andrade, Antenor (org.). Rio de Janeiro, RJ: Editora Fiocruz, 2010.
- LOWE, J. S.; ANDERSON, P. G. **Stevens e Lowe's Human Histology**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier, 2015, p. 369-370,376.
- LOWENSTINE, L. J. **A Primer of Primate Pathology: Lesions and Nonlesions**. Toxicologic Pathology, v. 31, n. 1_suppl, 2003, p. 92–102, 1.
- LUCIO, J. V. P. **Cambios post-mortem y data de la muerte en ambientes tropicales**. Medicina Legal de Costa Rica, 2013, v. 30, n. 2.
- MACHIDA, H.; PERKINS, E. M.; HU, F. The skin of primates. XXXV. The skin of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Oregon Regional Primate Research Center**, 1967, p.216.
- MANN, R.W.; BASS, W. M.; MEADOWS, L. Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. **Journal of Forensic Sciences**, 1990, v.35, n.1, p.103-11.
- MANSOOR, I.; LAI, J.; RANAMUKHAARACHCHI, S.; SCHMITT, V.; LAMBERT, D.; DUTZ, J.; HÄFELI, U. O.; STOEBER, B. **A microneedle-based method for the characterization of diffusion in skin tissue using doxorubicin as a model drug**. Biomed Microdevices. 2015;17(3):9967. doi: 10.1007/s10544-015-9967-4. PMID: 26009275.
- MEHREGAN, A. H.; ALBERTA, E.; PINKUS, H. **Artifacts in dermal histopathology**. Arch Dermatol. 1966, 94(2): p. 218-25. PMID: 5330108.
- MIRAGLIA, T.; NERY, J. W. C.; GUEDES, M. L. C. **The skin of the palms and soles of the marmosets (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*)**. Acta Anat (Basel). 1976;96(1):97-114. doi: 10.1159/000144664. PMID: 823786.
- MONTAGNA, W. The skin of nonhuman primates. **Integrative and Comparative Biology**, 1972, v. 12, n. 1, p. 109–124.
- MONTAGNA, W.; YUN, J. S.; MACHIDA, H. The Skin of Primates XVIII. THE SKIN OF THE RHESUS MONKEY (*Macaca mulatta*). **Oregon Regional Primate Research Center**, Beaverton, Oregon, 1964.
- MONTAGNA, W; YUN, J. S. The skin of primates. Xv. The skin of the chimpanzee (*Pan satyrus*). **Am J Phys Anthropol**. 1963, 21(2): p.189-203. doi: 10.1002/ajpa.1330210211. PMID: 14110695.
- MONTAGNA, W. 1966. Observations on the melanocytes of selected primates. Advan. Biol. Skin 8:59-88. Apud in: MONTAGNA, W. The skin of nonhuman primates. **Integrative and Comparative Biology**, 1972, v. 12, n. 1, p. 109–124.
- MONTAGNA, W. 1962. **The structure and function of skin**. 2^a ed. Academic Press, New York, 1962.

MONTAGNA, W.; YUN, J. S. The skin of primates. X. The skin of the ring-tailed Lemur (*Lemur catta*) United States Public Health Service, RG-2125(C12), the Colgate-Palmolive Company, and Chesebrough-Pond's, Inc. **American Journal of Physical Anthropology**, 1962, 20(2), p. 95–117. doi:10.1002/ajpa.1330200211.

MONTAGNA, W.; YUN, J. S. The skin of primates. VIII. The skin of the Anubis baboon (*Papio doguera*). **American Journal of Physical Anthropology**, 1962, 20(2), p. 131–141. doi:10.1002/ajpa.1330200214.

MUBIRU, J. Predicting total solar irradiation values using artificiais neurais networks. **Elsevier**, 2008.

NATIONAL PRIMATE PLAN. **Services National Institutes of Health**, p. 80–1520, 1980.

ORIÁ, R. B. *et al.* **Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 78, n. 4, p. 425–434, 2003.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter Bases da Histologia.** Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2008.

PERKINS, E.; SMITH, A. A. E; FORD, D. M. **A study of hair groupings in primates, in: Advances in the Biology of Skin. IX. Hair Growth** (W. Montagna e RL Dobson, eds.). Oxford: Pergamon Press. p.357-367, 1969.

PERKINS, E. M. **Phylogenetic significance of the shik of New World Monkeys (order primates, infraorder Platyrrhini).** Am J. Phys Anthropol, v. 42, n. 3, p. 395–423, 1975.

PISSINATTI, A.; ANDRADE, M. C. R. Histórico. In: **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanosna Pesquisa Biomédica.** Rio de Janeiro: Fiocruz. p.21-39, 2010.

PISSINATTI, A. GOLDSCHMIDT, B.; SOUZA, I. V. **Taxonomia In: Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica.** Rio de Janeiro: Fiocruz. p.41-55, 2010.

PRAXEDES, É. A.; OLIVEIRA, L. R. M.; SILVA, M. B.; BORGES, A. A.; SANTOS, M. V. O.; SILVA, H. V. R.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A. F. **Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin - An alternative approach to conservation of jaguar, Panthera onca (Linnaeus, 1758).** Cryobiology. 2019, v. 88: p. 15-22. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.04.007. Epub 2019 Apr 25. PMID: 31029688.

REDDY, K.; LOWENSTEIN, J. Forensics in dermatology: Part i. **J Am Acad Dermatol.** 2011, v. 64(5): p. 801-8. doi: 10.1016/j.jaad.2010.05.050.

REDDY, K.; LOWENSTEIN, J. Forensics in dermatology: Part ii. **J Am Acad Dermatol.** 2011, v. 64(5): p. 811-24. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2010.06.066.

REIS, N. R.; PERACCHI, I A. L.; ANDRADE, F. R. **Primatas Brasileiros.** Londrina, Pr: Universidade Estadual de Londrina, 2008.

RENEHAN, W. E.; MUNGER, B. L. **The development of meissner corpuscles in primate digital skin.** Developmental Brain Research, 1990, v. 51, n. 1, p. 35–44, 1 jan.

RICHARD, A. F.; GOLDSTEIN, S. J.; DEWAR, R. E. Weed macaques: the evolutionary implications of macaque feeding ecology. **Int J Primatol**, 1989. v. 10, n. 6, p. 569–594.

RICHTER, T.; BIEL, S. S.; SATTLER, M.; WENCK, H.; WITTERN, K. P.; WIESENDANGER, R.; WEPF, R. **Pros and cons: cryo-electron microscopic evaluation of block faces versus cryo-sections from frozen-hydrated skin specimens prepared by different techniques**. *J Microsc.* 2007 ;225(Pt 2):201-7. doi: 10.1111/j.1365-2818.2007.01732.x. PMID: 17359255.

RIVERA, E. Ética na Experimentação Animal In: **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002.

RODMAN, P. S. Structural differentiation of microhabitats of sympatric *Macaca fascicularis* and *M. nemestrina* in East Kalimantan, Indonesia. **Int J Primatol**, 1991, v. 12, n. 4, p. 357–75.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2012, p.144-170-175.

ROWE, N. **The pictorial guide to the living primates**. East Hampton, NY: Pogonias Pr, 1996, p. 263, 498, 503-504, 524.

RUSSELL WMS; BURCH RL. **The Principles of Humane Experimental Technique**. **Johns Hopkins**, 1959.

SAISSE, A. et al. **Controle Sanitário In: Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica**. Fiocruz, 2010, p. 259-313.

SALK, J. R. et al. Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis 1. A preliminary report of experiments in progress. **Journal of American Medical Association**, 1953, v. 151, p. 1081–1093.

SAMUELSON, D. A. **Tratado de Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2007

SCHIOZER, W. Banco de pele no Brasil. **Revista Brasileira de Queimaduras**, 2012, v. 11, n. 2, p. 53–55.

SETH, P. K., CHOPRA, P. K., SETH, S. **Indian rhesus macaque: habitat, ecology and activity patterns of naturally occurring populations**. In: Gupta AK, editor. **Vol 1(1), Non-human primates of India**. Dehradun, India: Wildl Inst India, 2001, p.68-80.

SINGH, M., SINHA, A. **Life history traits: ecological adaptations or phylogenetic relics** In: Thierry B, Singh M, Kaumanns W, editors. **Macaque societies: a model for the study of social organization**. Cambridge, UK: Cambridge. p.3-80, 2004.

SMITH, D. G.; MCDONOUGH, J. Mitochondrial DNA variation in Chinese and Indian rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Am J Primatol**, 2005, v. 65, n. 1, p. 1–25.

STEINMETZ, H. W.; KAUMANS, W.; DIX, I. *et al.* Coat condition, housing condition and measurement of faecal cortisol metabolites – a noninvasive study about alopecia in captive rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Journal of Medical Primatology**, 2006, v. 35, p. 3–11.

STRAUSS, J. S.; MATOLTSY, A. G. **Pele In: WEISS, L.; GREEP, R. O. Histologia**. 3ªed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1981, p.507-509.

SWIFT, B. **Essentials of Autopsy Practice The Timing of Death. Essentials of Autopsy Practice**, 2006.

TARDIF, S. ET AL. Preparing New World Monkeys for Laboratory Research. **ILARJournal**, 2006, n. 47, p. 307–315.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. **Princípios de anatomia e fisiologia** 14ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2016.

VENTURA-ANTUNES, L.; MOTA, B. H. S. **Different scaling of white matter volume, cortical connectivity, and gyrification across rodent and primate brains**. *Neuroanat*, 2013.

VITELLARO-ZUCCARELLO, L. *et al.* **Stereological analysis of collagen and elastic fibers in the normal human dermis: Variability with age, sex, and body region**. *American Association for Anatomy*, p. 153–162, 1994.

VILENSKY, J. A. **The function of ischial callosities**. *Primates*. 1978; 19: 363–369.

WASHBURN, S. L. Ischial callosities as sleeping adaptations. **Am J Phys Anthropol**, 1957 15(2):269-76. doi: 10.1002/ajpa.1330150215. PMID: 13470048.

WEBSTER JP. **Refrigerated skin grafts**. *Ann Surg*, 1944. v. 120, n. 4, p. 48–431.

WEI, W.; MICHU, Q.; WENJUAN, D. *et al.* **Histological changes in human skin 32 days after death and the potential forensic significance**. *Sci Rep* **10**, 18753, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76040-2>

WAGNER, S. A. **Color atlas of the autopsy**. 2ªed. CRC Press. Indianópolis, U.S., 2017 p.13-38.

WONG, R.; GEYER, S.; WENINGER, W.; GUIMBERTEAU, J. C.; WONG, J. K. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, 2015. <https://doi.org/10.1111/exd.12832>.

WOLF, R.; WOLF, D. **Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of atopic dermatitis**. *Clinics in Dermatology*, 2012. V. 30, p. 329-334. Doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.023. PMID: 22507048.

YOUNG, B. A. Temperature-induced changes in metabolism and body weight of cattle (*Bos taurus*). **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 1953, v. 53, n. 5, p. 947–953.

YOUSEF, H.; ALHAJJ, M.; SHARMA, S. **Anatomy, Skin (Integument), Epidermis**. StatPearls[Internet]. Treasure Island, FL: **StatPearls Publishing**, 2021.

ZACHARY, J. F.; DONALD, M.; GAVIN, M. C. **Bases da Patologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

ANEXO A: DISPENSA CEUA

De: Comissão de Ética no Uso de Animais <ceua@fiocruz.br>

Enviado: segunda-feira, 9 de novembro de 2020 13:16

Para: CLAUDIA ANDREA DE ARAUJO LOPES <claudia.lopes@fiocruz.br>

Cc: Carla Herlany Barbosa <carla.barbosa@fiocruz.br>

Assunto: Autorização de dispensa CEUA e arquivamento protocolo 30/20.1

Prezada Cláudia Lopes,

De acordo com a legislação vigente do CONCEA (Lei 11794/2008 e Decreto 6899/2009), uma vez que o projeto não fará uso de animais vivos e sim de carcaças provenientes de protocolos previamente licenciados, não se faz necessária uma licença CEUA. Por tal motivo, o protocolo 30/20.1, submetido à CEUA/FIOCRUZ, foi arquivado.

Atenciosamente,

CEUA/FIOCRUZ