

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE CAMUNDONGOS
ENDOGÂMICOS *BALB/c* EM DIFERENTES IDADES DE
ACASALAMENTO, COM OU SEM ENRIQUECIMENTO
AMBIENTAL**

VIRGÍNIA BARRETO MOREIRA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia, como parte das
exigências para obtenção do
título de Mestre.

BOTUCATU - SP
Julho – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE CAMUNDONGOS
ENDOGÂMICOS *BALB/c* EM DIFERENTES IDADES DE
ACASALAMENTO, COM OU SEM ENRIQUECIMENTO
AMBIENTAL**

VIRGÍNIA BARRETO MOREIRA

Zootecnista

Orientadora: Profa. Dra. Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura

Co-orientadora: Dra. Vânia Gomes de Moura Mattaraia

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia, como parte das
exigências para obtenção do
título de Mestre.

BOTUCATU - SP
Julho – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M838e Moreira, Virgínia Barreto, 1974-
Eficiência reprodutiva de camundongos isogênicos *BALB/c* em diferentes idades de acasalamento, com e sem enriquecimento ambiental / Virgínia Barreto Moreira. - Botucatu : [s.n.], 2011
iii, 42 f. : gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2011

Orientador: Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura
Co-orientador: Vânia Gomes de Moura Mattaraia
Inclui bibliografia

1. Camundongo *BALB/c*. 2. Bem-estar animal. 3. Enriquecimento ambiental. 4. Produção animal. I. Moura, Ana Silvia Alves Meira Tavares. II. Mattaraia, Vânia Gomes de Moura. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

Dedicatória

Aos meus pais, Maria Helena e Cícero, pelo apoio incondicional na realização deste projeto bem como, pelo amor com que me brindam todos os dias. Dedico também aos meus queridos irmãos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos o meu muito obrigada!

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus, a quem eu sempre recorro nos momentos de maior dificuldade e que sempre me auxilia com seu amor a superar os obstáculos mais difíceis.

A Profa. Dra. Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura, minha orientadora; a Dra. Vânia Gomes de Moura Mattaraia, minha co-orientadora, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, dedicação e empenho para o desenvolvimento dessa dissertação.

A Dra. Ubimara Pereira Rodrigues pela oportunidade e a todo corpo técnico do Biotério Central do Instituto Butantan pelo apoio recebido, em especial às funcionárias do Setor de camundongos isogênicos Ana Maria Braga e Dirce Custódio pela dedicação e firme vontade de fazer com que tudo desse certo.

A todos os professores que ofereceram disciplina nesse período e assim contribuíram de alguma forma para a reflexão dos temas abordados nesse projeto.

Aos colegas de mestrado que me receberam com muito carinho.

Aos professores que participaram da banca de Qualificação e Defesa, Prof. Dr. Edson Ramos de Siqueira, Dr. Paulo Sérgio Teixeira e Dra. Sueli Blanes Damy pelas sugestões e correções, que sem dúvida enriqueceram o trabalho.

Aos funcionários da seção de pós-graduação Seila Cristina Cassineli Vieira e Carlos Pazini Junior, sempre eficientes e prestativos, e a Bibliotecária Ana Lúcia Kempinas pela rapidez e atenção com que me tratou.

SUMÁRIO

	Página
CÁPITULO I	
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	2
Referências	14
CÁPITULO II	
EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS <i>BALB/c</i> EM DIFERENTES IDADES DE ACASALAMENTO, COM OU SEM ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	18
Resumo	19
Abstract	21
Introdução	22
Métodos.....	24
Resultados	27
Discussão	36
Conclusão.....	41
Referências	42
CÁPITULO III	
IMPLICAÇÕES	46

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Histórico

O camundongo é um roedor que acompanha o homem há vários milênios. Segundo dados recentes da paleontologia, a origem do gênero *Mus* se situa provavelmente na Ásia e existem também provas de que esses animais habitavam a China, Grécia e Turquia (Benavides e Guénet, 2003).

A introdução desses roedores em laboratório com fins experimentais se intensificou no começo do século XX. Neste período, a genética despontava como uma ciência que apresentava grande potencial para esclarecer muitos enigmas que rondavam o pensamento humano. A comunidade científica da época ainda refletia sobre o impacto das revelações de Charles Darwin com seu livro “A Origem das Espécies” (1859); no qual estabeleceu o vínculo entre as diferentes espécies animais num único processo evolutivo (apud Raymundo, 2002). De acordo com a teoria de Darwin, fazia sentido que os dados obtidos em pesquisas com modelos animais fossem extrapolados para os seres humanos.

Segundo Magalhães (2009), algumas condições importantes corroboraram para que o uso institucional do camundongo como modelo experimental ocorresse apenas no início do século XX: a redescoberta das leis de Mendel, em 1900, desencadeou um grande número de pesquisas em torno do fenômeno da hereditariedade; os trabalhos experimentais tomaram vulto com a instalação de muitos laboratórios; grande interesse em torno de pesquisas sobre câncer. Além do cenário altamente favorável ao fomento de pesquisas e descobertas na área genética, o surgimento de tumores espontâneos em algumas linhagens de camundongos os elevou a alvo prioritário nesse campo.

Atualmente, o camundongo é o animal mais utilizado na pesquisa Biomédica e o mais conhecido cientificamente para testes laboratoriais, com propósito de ensino e pesquisa biomédica (Andersen et al., 2004). Dentre as características que o tornam adequado ao uso nas pesquisas científicas, podemos citar o tamanho corporal, a docilidade, a facilidade de manuseio, a prolificidade e o ciclo de vida curto, que

possibilita a experimentação, o acompanhamento das pesquisas realizadas por várias gerações, em curto período de tempo e em espaço reduzido. Recentemente, dois fatores o elevaram à condição de principal modelo animal de doenças humanas: o primeiro foi a similaridade biológica que o aproxima do ser humano: estima-se que a homologia do DNA destas duas espécies esteja compreendida entre 70 a 90% (Godard, 2001); o segundo fator é a possibilidade de manipular seus genes através de técnicas moleculares e sistemas de acasalamento. Nas últimas décadas diferentes linhagens de camundongos transgênicos e *knockout* foram colocadas à disposição da pesquisa e experimentação animal. Estima-se que estejam disponíveis no mercado mundial mais de 2.000 linhagens de camundongos geneticamente modificados (Soares et al, 2001).

Os camundongos mais utilizados na produção de imunobiológicos pertencem a dois padrões genéticos distintos: heterogênicos ou *outbred* - derivados de acasalamentos não-endogâmicos apresentando, portanto, alta heterozigose - e isogênicos ou *inbred* - resultantes de pelo menos 20 gerações consecutivas de acasalamentos entre irmãos completos, gerando um índice de homozigose de 99%. Segundo Ko, (2009) a primeira linhagem isogênica produzida pelo acasalamento de sucessivas gerações de irmãos foi a DBA, obtida no início de 1900 por Clarence Little. Ele estudava a herança da cor da pelagem em camundongos e obteve um casal com genes recessivos de cor para diluído (d), marrom (b), e não agouti (a). Após os acasalamentos consecutivos entre irmãos descendentes do casal com genes recessivos para cor, por mais de vinte gerações, e seleção dos animais mais vigorosos, Clarence obteve a linhagem DBA.

A isogenia possibilitou a não rejeição de transplantes realizados entre indivíduos da mesma linhagem, despertando o interesse pela produção de linhagens isogênicas destinadas a estudar doenças humanas, o que por sua vez, gerou uma demanda muito grande por estes animais (Andersen et al., 2004). Atualmente conta-se com cerca de 500 diferentes linhagens de camundongos isogênicos (Ko, 2009). As linhagens isogênicas mais utilizadas nas pesquisas biomédicas são *BALB/c* e *C57Bl/6*.

Modelo animal e desenvolvimento ontogênico de camundongos

O camundongo é um mamífero da família Muridae, sub-família Murinae, da ordem Rodentia e gênero *Mus*. Seu nome científico é *Mus musculus*. Possui corpo fusiforme coberto de pelos, com uma cauda sem pelos e orelhas eretas arredondadas também desprovidas de pelos (Poole, 1987).

As fêmeas são poliétricas com ciclo estral de 4 a 5 dias de duração. Possuem ovulação espontânea, aproximadamente 8 a 11 horas após o início do estro, cio pós-parto e gestação com 19 a 21 dias de duração (Ko, 2009). Nas fêmeas, a abertura vaginal e o primeiro cio podem ocorrer aos 24 dias de idade (Cunliffe-Beamer, 1987). A maturidade sexual ocorre por volta de 4 a 6 semanas de idade (*Guidelines for breeding genetically engineered mice*, 2004).

São animais de pequeno porte, dóceis, sociáveis e curiosos. Os cinco sentidos são bem desenvolvidos, sendo o olfato considerado por muitos autores como o mais importante para a espécie, devido a sua complexa organização social. Segundo Rivera, (2009) estes animais criam padrões de deposição de urina, para com seu odor demarcar o território e para reconhecimento, tanto individual quanto do grupo.

Os filhotes nascem com pele avermelhada (linhagens albinas), desprovida de pelos, com exceção das vibrissas (órgãos de tato altamente sensitivos), olhos e pavilhão auricular fechados e orelhas coladas à cabeça, com peso ao nascer entre 1,0 a 1,5 g.

Devido à pele fina e a falta de pelos, após a primeira mamada pode-se visualizar o leite (mancha branca) no abdômen, mais precisamente no estômago. A presença de leite no estômago e sua quantidade são frequentemente usadas para identificar os animais mais competitivos, servindo, inclusive, como característica a ser avaliada na seleção dos animais mais fortes, com maior probabilidade de desenvolvimento e sobrevivência (Ko, 2009).

Com o passar dos dias a pele vai clareando, adquirindo uma tonalidade rosa bem clara. O nascimento dos pelos se torna evidente por volta de 3 a 4 dias de idade, caracterizando-se por uma penugem. Com 7 a 8 dias seu corpo está completamente envolto na pelagem característica da linhagem. A orelha se desprega totalmente da cabeça no quarto dia de vida, com abertura do pavilhão auricular ocorrendo,

aproximadamente, aos 12 dias. Os olhos se abrem a partir do décimo terceiro dia. Os dentes superiores e os inferiores rompem a gengiva com 10 e 11 dias, respectivamente. A partir do décimo segundo dia ingerem alimentos sólidos. Podem ser desmamados entre 21 e 28 dias, de acordo com o padrão genético (Moreira et al, 2005).

Bem-estar animal

O homem tem observado o comportamento dos animais desde os tempos primitivos. A grande quantidade de pinturas rupestres que retratam animais torna evidente a estreita ligação entre as diferentes espécies, caracterizando o domínio do homem (Fumdam, 2006). Ao longo do tempo, com o progresso científico e tecnológico, essa ligação foi se intensificando e resultou na completa subjugação dos animais de produção pelo homem. Concomitantemente a esse processo, vieram à tona questionamentos éticos sobre o uso de animais, quer seja em produção, quer seja em experimentação.

A publicação do livro-denúncia *Animal Machine* (1964) de Ruth Harrison, causou comoção e indignação ao descrever o sofrimento e a crueldade a que eram submetidos os animais criados e mantidos em confinamento, contribuindo de modo significativo para o interesse da população pelo tema bem-estar em animais. O impacto produzido na opinião pública levou o parlamento britânico a instituir, em 1965, o comitê Brambell. Ao tomar conhecimento desses fatos, a comunidade leiga passou a se manifestar, exigindo mudanças nos processos de produção e experimentação. Com a crescente pressão de certos setores da sociedade, alguns países passaram a adotar leis de proteção aos animais. O parlamento inglês instituiu, em 1979, o Conselho de Bem Estar de Animais de Produção (*Farm Animal Welfare Council – FAWC*), que teve suas diretrizes baseadas nas cinco liberdades: manter os animais livres de fome e sede; livres de desconforto físico e dor; livres de injúrias e doenças; livres de medo e estresse e livres para que manifestem os padrões comportamentais característicos da espécie.

Desde então, o debate sobre o bem-estar animal vem ganhando crescente relevância na comunidade internacional e no Brasil; e tem influenciado, cada vez mais, o comportamento da sociedade e seus hábitos de consumo. É um tema polêmico que

traz à tona a questão da senciência. A senciência tem sido um dos critérios mais utilizados para legitimar o direito do animal ao bem-estar (Duncan, 2006; Huntingford et al., 2006; Dawkins 2006). De acordo com pesquisas científicas, existem evidências genéticas, evolutivas, anatômicas, fisiológicas e comportamentais que indicam que os animais, mais especificamente os vertebrados, são dotados da capacidade de sentir e apresentam consciência de sensações e sentimentos. Segundo Dawkins (2006), entre os diferentes níveis que formam a consciência, o mais rudimentar é a senciência, evidenciando a existência de gradações entre as diferentes espécies de animais, de acordo com a evolução.

No Brasil, a instituição da Lei Arouca (nº 11794 de 08 de outubro de 2008), estabeleceu regras para a criação e a experimentação animal. O texto instituiu o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e regulamentou a constituição de Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs; condição indispensável para o credenciamento das instituições com atividades de ensino ou pesquisa com animais de laboratório.

O conceito de bem-estar é subjetivo e, num primeiro momento, esteve ligado mais à saúde física dos animais. Posteriormente, passou-se a ser definido de maneira mais ampla, incluindo, além do bem-estar físico, os aspectos mentais relacionados a sentimentos subjetivos. Segundo Broom (1986) bem-estar é o estado do animal em suas tentativas de se adaptar ao meio. Hughes e Duncan (1998) foram os primeiros a associar bem-estar à saúde física e psicológica, definindo-o como um estado de completa saúde física e mental em que o animal está em harmonia com o ambiente que o rodeia. Hurnik (1992) afirmou que bem-estar é o estado de harmonia caracterizado por condições físicas e fisiológicas ótimas e pela alta qualidade de vida do animal. Diante do exposto, torna-se evidente que o termo bem-estar está sujeito a constante evolução. Mas como afirmar, apoiado em dados científicos, que o animal está em condições de bem-estar físico e psicológico, completamente adaptado ao meio?

A preocupação dos pesquisadores, usuários e mantenedores de animais de laboratório, de se apoiarem em observações subjetivas, os levou a buscar dados concretos que comprovassem o bem-estar dos animais sob os seus cuidados. Atualmente, alguns indicadores fisiológicos e comportamentais vêm sendo utilizados

para demonstrar esse fato. É o caso de alterações fisiológicas como aumento de batimentos cardíacos e dos níveis de hormônios supra-renais associados ao estresse (cortisol), bem como comportamentos estereotipados e de aversão que caracterizam baixo grau de bem-estar (Mellen e Macphee, 2001). Os testes de preferência, muito usados em peixes, também podem contribuir para uma avaliação mais criteriosa do estado de bem-estar do animal. No momento em que o animal tem a possibilidade de manifestar sua preferência, a avaliação do estado de bem-estar deixa de ser externa e passa a emergir do próprio animal, ou seja, sua escolha reflete seu estado interno que é, então, assumido como seu estado de bem-estar num determinado momento (Volpato, 2007). Ainda segundo este autor, alguns cuidados na interpretação destes testes devem ser levados em consideração como, por exemplo, o número de opções a que o animal terá acesso, quantificação e intensidade da preferência, ritmo biológico e condição social entre outros; como forma de se evitar conclusões equivocadas. Segundo Dawkins (1983), tão importante quanto os testes de preferência na avaliação do bem-estar é a motivação que leva a determinada escolha, bem como a sua mensuração. Quanto mais criteriosos forem esses estudos mais chances de se chegar a conclusões que se aproximem do estado real de bem-estar dos animais. A implantação de técnicas de manejo, que não ignorem essas escolhas ou preferências e motivações, podem auxiliar na busca por um estado de bem-estar permanente.

Enriquecimento ambiental

As pesquisas sobre enriquecimento ambiental têm como objetivo conhecer a influência do ambiente sobre o comportamento dos animais. Estão alicerçadas nos conhecimentos da zoologia, psicologia e, principalmente, da etologia. As necessidades comportamentais e suas motivações têm sido abordadas com o intuito de desenvolver sistemas de manejo alternativos, que englobem os comportamentos adequados para a espécie, preservando assim o bem-estar dos animais cativos (Gonyou, 1993).

Um dos primeiros pesquisadores a perceber os efeitos do enriquecimento do ambiente sobre o comportamento de roedores foi Donald O. Hebb. Na década de 40, ele observou que ratos mantidos em ambientes maiores e com variedade de objetos, com os

quais interagem, demonstravam claramente habilidade superior de aprendizagem que ratos criados e mantidos em ambientes padronizados de laboratório (Hebb, 1947). Em 1964, Marian Diamond et al, retomaram as observações de Hebb e demonstraram, anatomicamente, algumas diferenças cerebrais entre os roedores criados com ou sem enriquecimento. Segundo a autora, os animais criados em ambiente enriquecido (gaiolas com rodas, escadas, rampas e mobília), desenvolviam um córtex cerebral mais espesso do que aqueles criados em ambiente pobre em objetos. Esse aumento da espessura do córtex se traduzia no aumento expressivo do número e ramificações de seus dendritos e das interconexões com outras células, beneficiando os processos de intercomunicação nas células do córtex, o que explicaria a maior capacidade de aprendizado dos animais criados em ambiente enriquecido.

Pesquisadores, conhecedores das características comportamentais do camundongo, desenvolveram algumas formas de enriquecer a gaiola ou ambiente. Chamove (1989) criou, em gaiolas de camundongos, repartições transparentes, horizontais e verticais, formando tocas com acesso entre elas, permitindo aos roedores que se escondessem quando se sentissem ameaçados, ou simplesmente seguros em seus ninhos, possibilitando também atividade locomotora. A presença de galerias de túneis, ou plataformas com diferentes níveis de acesso, além de proporcionar atividade locomotora, têm a finalidade de entreter os animais, possibilitando a manifestação de comportamentos mais próximos do que seria considerado natural. Outra forma de enriquecer o ambiente é utilizar objetos inanimados (mobília) dentro das gaiolas, de modo que o animal possa interagir com eles como, por exemplo, rodas de atividades, canos e brinquedos (Mellen e Macphee, 2001; Zimmermann et al, 2001).

Segundo Shepherdson et al. (1998), se os conhecimentos obtidos recentemente nos campos da etologia, psicologia e ciência animal forem aplicados, o enriquecimento ambiental pode ser uma forma alternativa e interessante de olhar para os ambientes que oferecemos aos animais cativos. Nesse contexto, ele pode ser definido como uma ferramenta usada com o objetivo de promover o bem-estar, diminuindo a incidência de comportamentos considerados anormais à espécie.

Os camundongos são animais sociáveis, com um sistema de hierarquia complexo. Ambientes que permitam o contato e o estabelecimento da hierarquia favorecem a

organização social, evitando brigas e agressões. Camundongos machos, agrupados em pequenas gaiolas, é uma condição social altamente artificial, situação em que os animais derrotados ou subordinados são impedidos de sair do território do dominante (Mattaraia, 2009). Nesse cenário, os comportamentos estereotipados também são estimulados. É comum em situações com número excessivo de animais por gaiola observá-los, principalmente nas linhagens isogênicas, em intensa agitação, andando de um lado para outro da gaiola, escalando a tampa de maneira repetitiva, sem interrupção, por longos períodos. Por outro lado, há relatos de comportamentos anormais em camundongos mantidos sozinhos desde a desmama, mais notadamente relacionados à ansiedade e ao medo (Schrijver et al., 2002).

Nos biotérios, os roedores são alimentados de forma previsível, com nenhum ou pouco esforço para obter comida. Segundo Neuringer (1969), quando esses animais têm a oportunidade de trabalhar para conseguir comida, em oposição a tê-la *ad libitum*, muitos optam pela primeira alternativa. Estes resultados sugerem que eles podem ter a necessidade biológica de buscar comida, e privá-los desta oportunidade pode ser uma causa de frustração e estresse. Nesse sentido, usar a técnica de alimento escondido pode ser um bom tipo de enriquecimento para a espécie.

O comportamento exploratório está intimamente relacionado com o recolhimento de informações do ambiente, a respeito da disponibilidade de recursos, tais como: pontos de fuga, esconderijos, além de alimento para o futuro (Mench, 1998). Segundo Griffin (1991), as informações recolhidas do ambiente formam processos mentais, onde a memória de situações passadas se junta ao presente e até mesmo à antecipação de situações futuras; levando o animal a decidir sobre que comportamento adotar em determinado momento. A organização do comportamento exploratório mostrou-se mais diversificada e complexa, com maior exposição aos predadores nos animais criados em ambiente enriquecido, caracterizando assim, um comportamento exploratório mais exacerbado que nos animais criados sem enriquecimento (Klein et al, 1994; Fernández-Teruel et al, 2002).

Em 1993, Galef questionou o conselho regulador (*Canadian Council on Animal Care*), que determinou o aumento da altura das gaiolas de ratos de 16,8 cm para 20 cm. Ele alegou que os ratos de laboratório daquela região eram descendentes de ratos

selvagens que, em ambiente natural, vivem em galerias subterrâneas compostas por túneis de aproximadamente 7,5 cm de altura, ligadas a câmaras de ninho com cerca de 14,5 cm de altura. Dessa forma, o excesso de altura poderia ter o efeito inverso ao desejado, configurando um efeito negativo ao bem-estar desses animais. De fato, o simples aumento do tamanho da gaiola não implica necessariamente em bem-estar do animal, uma vez que no espaço vazio (ambiente pobre) o animal fica completamente exposto. A exposição pode tornar o animal propenso a desenvolver comportamentos de medo e ansiedade. Nesse sentido, o enriquecimento do ambiente pode ser útil e tornar o aumento do tamanho da gaiola benéfico ao bem-estar, na medida em que o animal possa ter a oportunidade de se esconder quando se sentir ameaçado por qualquer motivo. Nesse contexto, o “abrigo” dentro da gaiola torna-se um item de grande importância para roedores.

Embora muitas pesquisas demonstrem o sucesso do enriquecimento ambiental, deve-se ter cuidado com as implicações dos tipos de instalações sobre a qualidade de vida dos animais pois, muitas vezes, um ambiente construído sob um “olhar humano” pode não ser o mais adequado ao bem-estar da espécie (Mellen e Macphee, 2001).

Para que a escolha do tipo de enriquecimento seja a mais adequada possível à espécie e, efetivamente, cumpra com o seu objetivo de promover o bem-estar animal, algumas características e comportamentos específicos devem ser analisados. O cuidado corporal é um comportamento característico do camundongo e um forte indicador de saúde física e psicológica desses animais.

Dentre os comportamentos do camundongo, talvez o que mais o caracterize seja o ato de confeccionar ninho. A ação de fazer ninho completa um dos mais básicos comportamentos desta espécie, pois não só o ajuda a proteger seus filhotes, mas também na termorregulação, ou quando desejam escapar da luz forte, para se esconder de predadores, companheiros ou outros estímulos (Rivera, 2009). Nesse contexto, pode-se afirmar que fornecer material para confecção do ninho é um dos melhores métodos de enriquecimento ambiental para a espécie. A escolha do material oferecido ao animal deve obedecer alguns requisitos: permitir autoclavação, evitando o risco de contaminações; ser econômico, uma vez que será utilizado em larga escala nos biotérios de produção; ser isento de riscos à saúde dos neonatos. Materiais duros e ásperos, ou

que absorvam demais a umidade, devem ser evitados, pois a pele desses animais é muito fina e suscetível a ferimentos. É imprescindível que o material seja fornecido inteiro, de modo que o animal possa moldá-lo, roendo-o ou rasgando-o para fazer o ninho. Esta atividade proporcionará entretenimento por um longo período de tempo, evitando a monotonia característica dos ambientes empobrecidos. A escolha do material adequado pode proporcionar também, a melhora dos índices produtivos, pois permite à fêmea a construção de um ninho mais rico e mais aquecido, estimulando o cuidado parental e assim diminuindo a mortalidade dos filhotes nos primeiros dias de vida.

Os biotérios de produção são ambientes controlados, com espaço limitado, onde se mantêm os animais em gaiolas, restringindo assim as possibilidades de enriquecer o ambiente. Nestas condições, o sucesso do enriquecimento ambiental para roedores em confinamento está estreitamente ligado ao sistema de acasalamento, à questão de segurança sanitária, à funcionalidade e à viabilidade econômica. Espera-se que o ambiente enriquecido contribua para melhorar os índices reprodutivos e minimizem a condição de estresse em confinamento, promovendo o bem-estar animal.

Manejo reprodutivo

Os biotérios de produção de camundongos adotam técnicas de manejo que levam em consideração as características genéticas e reprodutivas da espécie. Com o objetivo de otimizar a produção aplica-se o acasalamento intensivo, que consiste na manutenção ininterrupta de macho e fêmea(s) na mesma gaiola, por toda a vida reprodutiva. Este sistema permite o aproveitamento do cio pós-parto e, conseqüentemente, a produção de outra cria em tempo reduzido. Desse modo, a fêmea pode estar amamentando uma ninhada, ao mesmo tempo em que gera outra. Se, por algum motivo, a fêmea não for coberta pelo macho no cio pós-parto, só entrará em cio novamente após o desmame, diminuindo o número de crias por fêmea por unidade de tempo.

Para a criação de linhagens isogênicas, aplica-se manejo reprodutivo específico como o acasalamento entre irmãos ao desmame (21 ou 28 dias de idade), antes da maturidade sexual, com a finalidade de preservar o padrão genético da colônia (*Guidelines for breeding genetically engineered mice*, 2004). Entretanto, não contamos

com evidência científica que ateste que esta prática não interfira na vida reprodutiva dos animais acasalados precocemente. A eventual diminuição da vida útil reprodutiva desses roedores implicaria na reposição de matrizes em intervalos mais curtos de tempo, criando cenário difícil, uma vez que os animais isogênicos apresentam menor fertilidade, menor prolificidade e uma tendência maior ao estresse e ao canibalismo, quando comparados às linhagens heterogênicas.

A implantação do sistema de estratificação de colônias também é uma estratégia utilizada pelos bioteristas com o intuito de garantir o atendimento de altas demandas e, principalmente, de manter o padrão genético dos animais. Através do estabelecimento da hierarquia entre as colônias, os biotérios produzem animais em larga escala e, ao mesmo tempo, garantem a qualidade genética deles. As colônias fundadoras, independentemente do padrão genético, devem ser pequenas, constituídas de casais monogâmicos, com o objetivo de se autopropetuar e produzir matrizes para o segundo estrato: a colônia de expansão. Esta pode ser mono ou poligâmica; terá seu tamanho determinado de acordo com a demanda e apresenta a função de alimentar a colônia de produção. A colônia de produção deve ser poligâmica e sua produção será destinada aos usuários.

Para a manutenção do padrão genético das linhagens isogênicas, a estratificação das colônias tem manejo diferenciado. A colônia fundadora deve ser formada, obrigatoriamente, por acasalamentos monogâmicos entre irmãos completos, ao desmame. A colônia intermediária ou de expansão deve ser sempre mantida por acasalamentos entre irmãos completos oriundos da colônia fundadora; porém, não há restrição quanto ao número máximo de fêmeas, uma vez que o seu tamanho deve ser proporcional à demanda. Os reprodutores que formam a colônia de produção devem ser obrigatoriamente, oriundos da expansão, não necessitam ser irmãos e devem ser acasalados poligamicamente, de acordo com o espaço disponível. É importante salientar que os animais oriundos dessa colônia não podem ser aproveitados como reprodutores, devem ser destinados exclusivamente aos usuários, garantindo assim a isogenicidade da colônia (Poole, 1986).

O capítulo 2, denominado Eficiência reprodutiva de camundongos isogênicos *BALB/c* em diferentes idades de acasalamento, com ou sem enriquecimento ambiental,

apresenta-se de acordo com as normas da revista *Applied Animal Behaviour Science*. O objetivo deste estudo foi avaliar se a idade de acasalamento da linhagem isogênica *BALB/c* pode interferir na vida útil reprodutiva e qual é a influência do ambiente enriquecido no desempenho produtivo desses animais.

Referências

ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E.; TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP, 2004.

BENAVIDES, F. J.; GUÉNET, J. L. **Manual de genética de roedores de laboratório: principios básicos y aplicaciones**. Madrid: Universidad de Alcalá, SECAL y Laboratory Animals, 2003.

BRAMBELL, F. W. R. **Report of the technical committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1965.

BRASIL. Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jul. 2009. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm>. Acesso em: 06 jun. 2011.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 out. 2008. Disponível em: <http://www.mpes.gov.br/anexos/centros_apoio/arquivos/10_213915473722102008_Lei%2011.794-2008.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2011.

BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, v. 142, n. 6, p. 524-526, 1986.

CHAMOVE, A. S. Cage design reduces emotionality in mice. **Laboratory Animals**, v. 23, n. 3, p. 215-219, 1989.

CUNLIFFE-BEAMER, T. L.; LES, E. P. The laboratory mouse. In: POOLE, T. B. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. 6th ed. British: Blackwell Science, 1987. cap. 18, p. 275-308.

DAWKINS, M. S. Battery hens name their price: consumer demand theory and the measurement of ethological 'needs'. **Animal Behaviour**, London, v. 31, n. 4, p. 1195-1205, 1983.

DAWKINS, M. S. Through animal eyes: what behaviour tell us. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 100, n. 1, p. 4-10, 2006.

DIAMOND, M. C.; KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R. The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. **Journal of Comparative Neurology**, v. 123, p. 111-119, 1964.

DUNCAN, I. J. H. The changing concept of animal sentience. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 100, n. 1, p. 11-19, 2006.

FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL. (FAWC). Disponível em: <www.fawc.org.uk>. Acessado em: 08 out. 2010.

FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; ESCORIHUELA, R. M.; GIL, L.; AGUILAR, R.; TEIMER, T.; TOBEÑA, A. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 233-245, 2002.

FUNDAÇÃO MUSEU DO HOMEM AMERICANO. FUMDHAM. **Pinturas rupestres**: Parque Nacional Serra da Capivara. Piauí. Disponível em: <http://www.fumdam.org.br/pinturas_rupestres.html>. Acessado em: 14 fev. 2011.

GALEF JR., B. G. Should large rats be housed in large cages. **Canadian Psychologie Canadienne**, v. 34, n. 2, p. 203-207, 1993.

GODARD, A. L. B. O espelho milagroso: o poder do camundongo. **Jornal da ANBio**: Associação Nacional de Biossegurança, v. 1, n. 2, p. 6. 2001. Disponível em: <<http://www.anbio.org.br/jornais/jornal/pag6.htm>>. Acesso em: 06 jun. 2011.

GONYOU, H. W. Why the study of animal behavior is associated with the animal welfare. **Journal of Animal Science**, v. 8, n. 72, p. 2171-2177, 1993.

GRIFFIN, D. R. Progress toward a cognitive ethology. In: RISTAU, C. A. (Ed.). **Cognitive ethology**. Hillsdale: Lawrence Erlbaum, 1991. p. 3-17.

GUIDELINES FOR BREEDING GENETICALLY ENGINEERED MICE. 2004. Disponível em: <<http://www.med.nyu.edu/dlar/assets/breedinggeneticallyengineeredmice.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2008.

HARRISON, R. **Animal machines**. London: Vincent Stuart, 1964.

HEBB, D. O. The effects of early experience on problem-solving at maturity. **The American Psychologist**, v. 2, p. 306-307, 1947.

HUGHES, B. O.; DUNCAN, I. J. H. The notion of ethological need, models of motivation and welfare. **Animal Behaviour**, v. 36, n. 6, p. 1696-1707, 1998.

HUNTINGFORD, F. A.; ADAMS, C.; BRAITHWAITE, V. A.; KADRI, S.; POTTINGER, T. G.; SANDØE, P.; TURNBULL, J. F. Current issues in fish welfare. **Journal of Fish Biology**, v. 68, n. 2, p. 332-372, 2006.

HURNIK, J. F.; BEHAVIOUR, I. N.; PHILLIPS, C.; PIGGINS, D. (Ed.). **Farm animals and the environment**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 235-244.

KLEIN, S. L.; LAMBERT, K. G.; DURR, D.; SCHAEFER, T.; WARING, R. E. Influence of environmental enrichment and sex predator stress response in rats. **Physiology and Behavior**, v. 56, n. 2, p. 291-297, 1994.

KO, G. M. Camundongo. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V., G., M.; KO, G., M. (Ed.). **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 137-164.

MAGALHÃES, L. E. Evolução da ciência de animais de laboratório. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. (Ed.). **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 3-9.

MATTARAIA, V. G. M. Enriquecimento ambiental. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. (Ed.). **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 537-547.

MELLEN, J.; MACPHEE, M. S. Philosophy of environmental enrichment: Past, present, and future. **Zoo Biology**, v. 20, n. 3, p. 211-226, 2001.

MENCH, J. Environmental enrichment and the importance of exploratory behavior. In: SHEPHERDSON, D. J.; MELLEN, J. D.; HUTCHINS, M. (Ed.). **Second nature: environmental enrichment for captive animals**. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1998. p. 30-46.

MOREIRA, V. B.; TAVORA, M. F. C. L. F.; RODRIGUES, U. P.; GHIURO, E. J. V.; MATTARAIA, V. G. M. Development of *BALB/c* mice in the Biotério Central of the Instituto Butantan. In: REUNIÃO ANNUAL DO INSTITUTO BUTANTAN, 12., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Butantan, 2005.

NEURINGER, A. Animals respond for food in the presence of free food. **Science**, v. 166, n. 903, p. 339-341, 1969.

POOLE, T. B. (Ed.). **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. 6th ed. London: UFAW, Churchill Livingstone, 1987. 635 p.

RAYMUNDO, M. M.; GOLDIM J. R. Ética da pesquisa em modelos animais. **Bioética**, v. 10, n. 1, p. 31-44, 2002.

RIVERA, E. A. B. Bem-estar animal. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. (Ed.). **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 59-69.

SCHRIJVER, N. C. A.; BAHR, N. I.; WEISS, I. C.; WÜRBEL, H. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 209-224, 2002.

SHEPHERDSON, D.; MELLEN, J.; HUTCHÍNS, M. (Ed.). **Second nature:** environmental enrichment for captive animals. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1998.

SOARES, M. B. P.; CARVALHO, L. C. P.; SANTOS, R. R. Banco de embriões de camundongos geneticamente modificados. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, p. 50-53, 2001.

VOLPATO, G. L. Considerações metodológicas sobre os testes de preferência na avaliação do bem-estar em peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 53-61, 2007.

ZIMMERMANN, A.; STAUFFACHER, M.; LANGHANS, W.; WURBEL, H. Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. **Behavioural Brain Research**, v. 121, n. 1/2, p. 11-20, 2001.

CAPÍTULO 2

Eficiência reprodutiva de camundongos isogênicos *BALB/c* em diferentes idades de acasalamento, com ou sem enriquecimento ambiental

RESUMO

No Brasil, os biotérios de produção precisam atender elevada demanda de animais, com padrões genéticos e sanitários definidos e, por outro lado, existe a necessidade de considerar a crescente preocupação de setores da sociedade e dos órgãos reguladores, que trazem à discussão o tema do bem-estar dos animais de laboratório, em condição de cativeiro, mesmo que não estejam submetidos à experimentação. O objetivo deste estudo foi avaliar três idades de acasalamento (28, 45 e 60 dias) para camundongos da linhagem *BALB/c*, alojados em gaiolas enriquecidas ou não e suas influências no desempenho produtivo. O experimento teve a duração de 310 dias, do primeiro acasalamento até o desmame da última ninhada. Usou-se 60 casais de camundongos da linhagem *BALB/c*, de padrão sanitário controlado, criados e mantidos em ambiente padronizado. Eles foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 3 x 2 (três idades de acasalamento e alojamento com ou sem enriquecimento ambiental). Como forma de enriquecimento da gaiola foram utilizados tubos de papelão (com aproximadamente 10 cm de comprimento e 4 cm de diâmetro), previamente embalados e autoclavados. Foram analisadas características relacionadas à fertilidade, idade ao primeiro parto, intervalo entre partos, número de nascidos e desmamados totais e médio por ninhada, mortalidade pré-desmame e peso da ninhada ao desmame. Não houve efeito da interação enriquecimento x idade de acasalamento sobre as características estudadas. Tanto o enriquecimento, quanto a idade de acasalamento, influenciaram a mortalidade pré-desmame. Nas gaiolas enriquecidas a mortalidade pré-desmame foi mais baixa ($P=0,01$) que nas não enriquecidas (0,80 e 1,87 respectivamente). O acasalamento aos 28 dias resultou em mortalidade mais baixa ($P = 0,01$) comparado ao acasalamento aos 60 dias, enquanto o acasalamento aos 45 dias apresentou resultado intermediário (0,6; 2,25 e 1,16 mortes, respectivamente). Não foram detectados efeitos dos tratamentos sobre as demais características analisadas. Os resultados sugerem que a implantação de um programa de enriquecimento ambiental para camundongos isogênicos, em sistema intensivo de produção, poderá melhorar os índices produtivos, na medida em que

diminuirá, consideravelmente, a mortalidade pré-desmame, além de proporcionar a manifestação de comportamentos característicos da espécie e contribuir para o bem-estar.

Palavras chave: *BALB/c*, Bem-estar, Enriquecimento Ambiental, Produção Animal.

ABSTRACT

In Brazil, the centers for production of laboratory animals need to meet a high demand for rodents with defined genetic and health status and, on the other hand, there is the need to consider the growing concern of the society and of the regulatory agencies regarding captive laboratory animals welfare, even though they are not under research protocols in those centers. The objective of this study was to evaluate the effect of three breeding ages (28, 45 and 60 days) on mice from the *BALB/c* strain, housed in enriched or non-enriched cages and their influence on the productive performance. The experiment lasted 310 days, from the first mating to weaning of the last litter. Sixty mouse couples from the *BALB/c* strain, with controlled health status, raised and kept under standardized environment were used. They were assigned to a completely randomized design in a 3 x 2 factorial arrangement (three breeding ages and cage with or without enrichment). Card paper tubes, approximately 10 cm long and with a diameter of 4 cm, were previously packed and autoclaved and used as cage enrichments. Traits related to fertility, age at first parturition, parturition interval, number born and weaned (total and litter average), pre-weaning mortality rate and litter weight at weaning were analyzed along the entire reproduction period. The breeding age x cage enrichment interaction did not affect any of traits under study, but each of these effects separately affected pre-weaning mortality. In the enriched cages, pre-weaning mortality was lower ($P=0.01$) than in non-enriched cages (0.80 vs. 1.87 deaths, respectively). Breeding at 28 days resulted in lower mortality ($P= 0.01$) compared to breeding at 60 days, whereas at 45 days an intermediary value was found (0.60, 2.25 and 1.16 deaths, respectively). No other effects of the treatments were detected ($P>0.05$) on the traits under study. The implantation of an enrichment program for inbred mice under an intensive production system will improve productivity by reducing pre-weaning mortality rates besides contributing to the welfare of animals.

Keywords: *BALB/c*, welfare, environmental enrichment, animal production.

1. Introdução

Por muitos anos os animais de laboratório foram considerados verdadeiras máquinas de produção, com a finalidade de atender a necessidade de matéria prima ou controle de qualidade de produtos como fármacos, cosméticos e imunobiológicos, sem se considerar que são seres sencientes. Esta postura não é mais aceita; atualmente há a preocupação dos pesquisadores, usuários e mantenedores de animais de laboratório de não se apoiarem em observações subjetivas, buscando dados concretos que demonstrem o bem-estar dos animais sob os seus cuidados. A evolução da ciência e os questionamentos sobre o uso de animais em experimentação alteraram as relações entre eles e o ser humano, transformando o bem-estar em uma importante área de estudo (Frajblat, et al, 2008). Na tentativa de minimizar a condição de cativeiro dos roedores, têm-se utilizado ferramentas que promovam o enriquecimento ambiental (Van de Weerd e Baumans, 1995). Entretanto, ainda não se dispõe de informações suficientes sobre a aplicação deste recurso, quando aliado às técnicas de manejo em sistema intensivo de produção.

Os biotérios de produção são ambientes controlados, com espaço limitado, onde os animais são mantidos em gaiolas, restringindo assim as possibilidades de enriquecer o ambiente. Os técnicos destes biotérios necessitam de informações alternativas que sejam funcionais, seguras quanto à questão de contaminação e econômicas, com o objetivo da melhoria dos índices reprodutivos e na tentativa de minimizar a condição de cativeiro e promover o bem-estar animal (Mattaraia, 2009).

Segundo Andersen (2004), a demanda por animais isogênicos cresce a cada ano. No entanto, os bioteristas carecem ainda, na atualidade, de evidencia científica sobre a melhor técnica de manejo reprodutivo para eles, nas nossas condições de ambiente. Apesar das limitações que a isogenia impõe, a falta de pesquisas científicas que alicercem a prática do

acasalamento precoce em camundongos isogênicos implica em incertezas, pois não se tem segurança no manejo adotado.

O objetivo deste estudo foi avaliar se a idade de acasalamento da linhagem isogênica *BALB/c* pode interferir na vida útil reprodutiva dos casais e qual é a influência do ambiente enriquecido no desempenho produtivo desses animais, considerando-se como vida útil o tempo que eles permaneceram em reprodução, ou seja, o período de trezentos e dez dias, que corresponde ao número de dias entre a data do acasalamento e a data de pesagem da última cria (nono parto).

2. Métodos

2.1. Condições gerais de ambiente e manejo

O experimento foi realizado na Área de Produção de Camundongos Isogênicos do Biotério Central do Instituto Butantan – SP – Brasil. As salas dos animais apresentam fluxo de pessoas e insumos definido, e são protegidas com barreiras sanitárias (autoclave de barreira, sistema de filtração de ar, diferencial de pressão, etc.). A temperatura ambiente é controlada: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, existe sistema de exaustão na altura das gaiolas, impedindo a dispersão da amônia no ambiente, ocorrem 15 a 20 trocas de ar/h e o ciclo de luz é definido (12L:12D). Todo o sistema é ligado a um gerador, que garante a manutenção em caso de falta de energia elétrica.

O modelo biológico utilizado foi o camundongo *BALB/c* linhagem isogênica, oriunda do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais eram de padrão sanitário controlado, mantidos em gaiolas de polipropileno, que permitiam livre acesso à água potável e à ração. As gaiolas foram forradas com cama de maravalha autoclavada. A rotina de manejo dos animais compreendeu duas trocas semanais de gaiola e água fresca três vezes por semana. A ração comercial peletizada, própria para a espécie (Nuvital[®]), foi oferecida *ad libitum*, com os seguintes níveis de garantia: proteína bruta mínima de 22%, matéria fibrosa máxima de 8%, umidade máxima de 12,5%, extrato etéreo mínimo de 4%, matéria mineral máxima de 10%, cálcio máximo de 1,4% e fósforo mínimo de 0,8%. A formulação obedeceu as recomendações do *National Research Council* (1995). Todos os procedimentos obedeceram as recomendações do *Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience* (2003) e foram aprovados pela Comissão de Ética e Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, sob protocolo nº 136/2009.

2.2. Protocolo experimental

Como forma de enriquecimento ambiental foram utilizados tubos de papelão com 4 centímetros de diâmetro e 10 centímetros de comprimento, previamente embalados e autoclavados, certificando-se a esterilidade dos mesmos, com o uso de bioindicadores. Os animais do grupo enriquecido recebiam um tubo de papelão, introduzido na gaiola a cada troca. Foram reservados 130 animais, prevendo-se possíveis perdas pré-experimentais e utilizados sessenta casais de irmãos completos, distribuídos em seis grupos, num delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 3 x 2 (três idades de acasalamento e alojamento com ou sem enriquecimento ambiental):

- Grupo Não Enriquecido 28 (NE-28): os animais foram acasalados aos 28 dias de idade e não receberam canudo durante todo o experimento;
- Grupo Enriquecido 28 (E-28): animais acasalados aos 28 dias de idade e que receberam um canudo a cada troca de gaiola, durante todo o experimento;
- Grupo Não Enriquecido 45 (NE-45): os animais foram acasalados com 45 dias de idade e não receberam canudo durante todo o experimento;
- Grupo Enriquecido 45 (E-45): animais acasalados aos 45 dias de idade e que receberam um canudo a cada troca de gaiola, durante todo o experimento;
- Grupo Não Enriquecido 60 (NE-60): animais acasalados aos 60 dias de idade e que não receberam canudo durante todo o experimento;
- Grupo Enriquecido 60 (E-60): animais acasalados aos 60 dias de idade e que receberam canudo a cada troca de gaiola, durante todo o experimento.

Esta formação foi mantida por trezentos e dez dias, período que correspondeu a duração do experimento, desde o acasalamento aos 28 dias até o encerramento, após a pesagem da última ninhada aos 28 dias de idade (nono parto). A determinação do encerramento do experimento foi baseada no número de fêmeas por ordem de parto ao longo do tempo.

Os animais utilizados eram todos da mesma idade, provenientes de diferentes ninhadas. Os acasalamentos foram entre irmãos completos, da mesma ninhada, para manter a isogenicidade da linhagem *BALB/c*. Todos eles (120 animais) foram desmamados no mesmo dia, com idade de 28 dias, alojados separadamente por sexo, em gaiolas identificadas por fichas e dispostas lado a lado, permitindo a identificação dos irmãos, para que não se perdesse a endogamia característica da linhagem *BALB/c*. Neste mesmo dia, foram sorteados, aleatoriamente, 20 machos e 20 fêmeas (irmãos), que foram acasalados imediatamente, formando os grupos NE-28 e E-28. Os animais restantes (80) permaneceram nas mesmas gaiolas, identificadas e dispostas lado a lado, permitindo que se identificassem os irmãos. Aos 45 dias de idade repetiu-se o processo e foram formados mais 20 casais, todos sorteados aleatoriamente, mantendo o acasalamento entre irmãos (NE-45 e E-45). Os animais restantes foram acasalados ao completarem 60 dias de idade, formando os grupos NE-60 e E-60. Desde o início até a formação do último grupo, nenhum animal permaneceu isolado, ficando, no mínimo, dois animais por gaiola. Os sorteios ocorreram tanto em relação à formação dos grupos, quanto em relação à posição das gaiolas nas estantes.

Todos os casais foram mantidos em sistema monogâmico intensivo, por toda a vida reprodutiva (trezentos e dez dias). Durante esse período foram avaliadas as seguintes características: fertilidade, número de partos, duração do ciclo, número de mortos, idade ao primeiro parto, intervalo médio entre partos, taxa de mortalidade, taxa de mortalidade transformada e tempo por filhote desmamado. Características relacionadas ao peso: ao nascer, à desmama e aos 28 dias, peso médio da ninhada ao nascer, à desmama, aos 28 dias e ganho de peso do nascimento à desmama. Características relacionadas à produtividade numérica total e média: nascidos e desmamados totais, nascidos e desmamados médios por ninhada.

2.3. Análise estatística

Foram utilizados dois modelos estatísticos distintos, de acordo com as características analisadas. O primeiro, usado para avaliar a produção total (vitalícia) dos casais, envolveu os

efeitos fixos de idade de acasalamento, do enriquecimento e da interação, mais o erro aleatório. Esta análise foi conduzida com o auxílio do procedimento GLM do SAS (2003). O segundo, usado para avaliar a evolução dos índices reprodutivos ao longo das parições sucessivas, além dos efeitos fixos já descritos, envolveu também medidas repetidas (ordens de parição). Esta segunda análise foi conduzida com o auxílio do procedimento MIXED do SAS (2003).

Resultados

Não houve interação entre as idades de acasalamento e o enriquecimento do ambiente para as características estudadas.

O número de partos por fêmea não diferiu entre os tratamentos, sendo que apenas 6,7% das fêmeas alcançaram o décimo parto (figura 1).

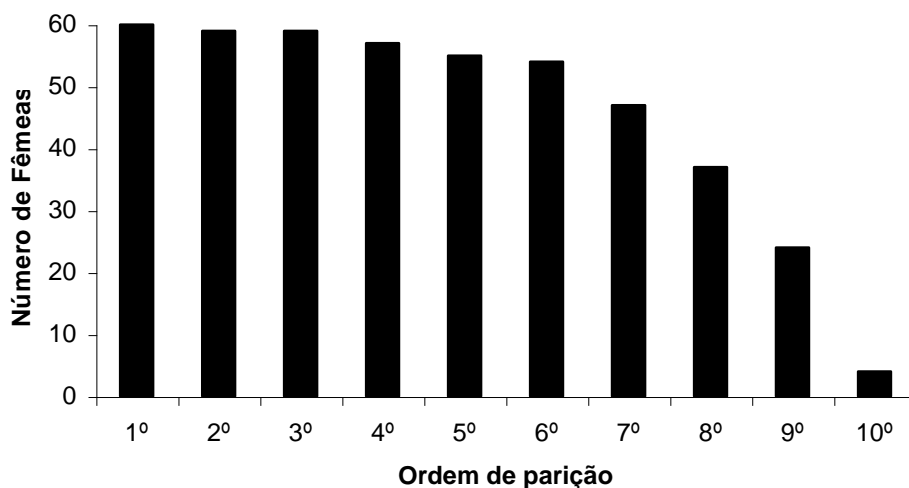


Figura 1. Número total de fêmeas de acordo com a ordem de parição em camundongos endogâmicos *BALB/c*.

Não se detectou diferença no número de nascidos totais (Tabela 1) e médios por ninhada (Tabela 2). Também não houve diferença com relação ao número de desmamados totais (Tabela 1) e médios (Tabela 2).

Tabela 1: Médias de quadrados-mínimos (erro padrão) das características de produção global de camundongos endogâmicos *BALB/c*, em diferentes idades de acasalamento, alojados em ambiente enriquecido ou não.

Características	Enriquecimento		Valor de P	Idade de acasalamento			Valor de P
	Sim	Não		28 dias	45 dias	60 dias	
Número de partos (NP)	7,7 ± 0,3	7,5 ± 0,3	0,69	7,4 ± 0,4	7,8 ± 0,4	7,5 ± 0,4	0,84
Duração do ciclo (DC) ¹	270,9 ± 6,8	256,6 ± 6,8	0,14	279,1 ± 8,3 ^a	264,9 ± 8,3 ^{ab}	247,2 ± 8,3 ^b	0,03
Nascidos totais (NT)	42,5 ± 2,1	40,8 ± 2,1	0,57	41,0 ± 2,5	43,2 ± 2,5	40,6 ± 2,5	0,75
Desmamados totais (DT)	41,7 ± 2,2	38,9 ± 2,2	0,38	40,4 ± 2,6	42,0 ± 2,6	38,4 ± 2,6	0,62
Número de mortos (M)	0,8 ± 0,3	1,9 ± 0,3	0,01	0,6 ± 0,4 ^b	1,2 ± 0,4 ^{ab}	2,2 ± 0,4 ^a	0,01
Idade ao primeiro parto (IPP) ¹	93,0 ± 3,5	88,9 ± 3,5	0,42	90,2 ± 4,3	87,3 ± 4,3	95,2 ± 4,3	0,44
Peso ao nascer total (PNT) ²	70,4 ± 3,6	66,6 ± 3,6	0,46	68,7 ± 4,4	70,4 ± 4,4	66,3 ± 4,4	0,80
Peso a desmama total (PDT) ²	506,6 ± 26,1	469,0 ± 26,1	0,31	494,5 ± 32,0	500,1 ± 32,7	468,7 ± 32,7	0,78
Peso total aos 28 dias (P28T) ²	728,0 ± 37,9	672,8 ± 37,9	0,31	710,3 ± 46,3	718,5 ± 47,4	672,4 ± 47,4	0,76

Unidades¹: DC, IPP = dias; Unidades²: PNT, PDT, P28T = peso em gramas; ^{a,b}: Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

DC= número de dias entre o acasalamento e a desmama da última ninhada do casal.

M= número de nascidos totais menos o número de desmamados totais.

Tabela 2: Médias de quadrados-mínimos (erro padrão) das características de produção por ninhada de camundongos endogâmicos *BALB/c*, em diferentes idades de acasalamento, alojados em ambiente enriquecido ou não.

Características	Enriquecimento		Valor de P	Idade de acasalamento			Valor de P
	Sim	Não		28 dias	45 dias	60 dias	
Nascidos médios por ninhada (NTM)	5,5 ± 0,2	5,5 ± 0,2	0,89	5,7 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,3 ± 0,2	0,51
Desmamados médios por ninhada (DTM)	5,4 ± 0,2	5,1 ± 0,2	0,35	5,5 ± 0,2	5,3 ± 0,2	5,0 ± 0,2	0,31
Peso médio da ninhada ao nascer (PNTM) ²	9,1 ± 0,3	8,8 ± 0,3	0,40	9,3 ± 0,4	8,9 ± 0,4	8,6 ± 0,4	0,49
Peso médio da ninhada à desmama (PDTM) ²	65,7 ± 2,1	61,5 ± 2,1	0,16	67,3 ± 2,5	64,3 ± 2,6	59,2 ± 2,6	0,09
Peso médio da ninhada 28 dias (P28TM) ²	94,7 ± 3,2	88,2 ± 3,2	0,16	96,7 ± 3,9	92,6 ± 4,0	85,0 ± 4,0	0,12
Intervalo médio entre partos (IPM) ¹	32,4 ± 1,4	30,1 ± 1,4	0,24	31,2 ± 1,7	32,5 ± 1,7	30,0 ± 1,7	0,60
Taxa de mortalidade (TM) ³	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,14	0,02 ± 0,02 ^a	0,04 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,02 ^a	0,30
Taxa de mortalidade transformada (TMT) ³	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,03	0,05	0,1 ± 0,03 ^b	0,1 ± 0,03 ^{ab}	0,2 ± 0,03 ^a	0,03
Tempo por filhote desmamado (TFD) ¹	9,0 ± 1,8	7,5 ± 1,8	0,55	7,4 ± 2,2	9,8 ± 2,2	7,5 ± 2,2	0,68
Ganho de peso da ninhada do nascimento à desmama. (GP) ²	436,5 ± 22,3	402,1 ± 22,3	0,28	425,8 ± 27,4	430,9 ± 27,4	401,2 ± 27,4	0,71

Unidades¹: IPM, TFD = dias; Unidades²: PNTM, PDTM, P28TM, GP = peso em gramas; Unidades³: TM, TMT = %; ^{ab}: médias seguidas de diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

NTM= número de nascidos totais dividido pelo número de partos; DTM= número de desmamados totais dividido pelo número de partos; GP= peso à desmama total menos o peso ao nascer total.
 PNTM= peso ao nascer total dividido pelo número de partos; PDTM= peso à desmama total dividido pelo número de partos;
 P28TM= peso total aos 28 dias dividido pelo número de partos; TM= número de mortos dividido pelo número de nascidos totais;
 TMT= arco seno da raiz quadrada da Taxa de Mortalidade; TFD= duração do ciclo dividido pelo número de desmamados totais;

A ordem do parto influenciou ($P = 0,03$) o número de desmamados médios por ninhada (Figura 2).

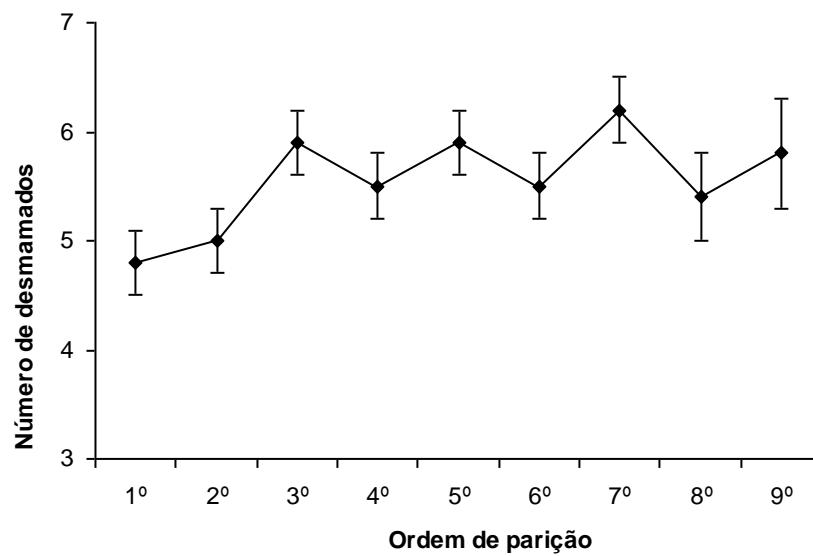


Figura 2. Número de desmamados de acordo com a ordem de parição em camundongos endogâmicos *BALB/c*, em diferentes idades de acasalamento, alojados em ambiente enriquecido ou não.

A mortalidade pré-desmama (M), tanto a total (Tabela 1), como a média por ninhada (Tabela 2), diferiram entre os tratamentos. O enriquecimento reduziu o número total de mortos por ninhada (Tabela 1 e Figura 3).

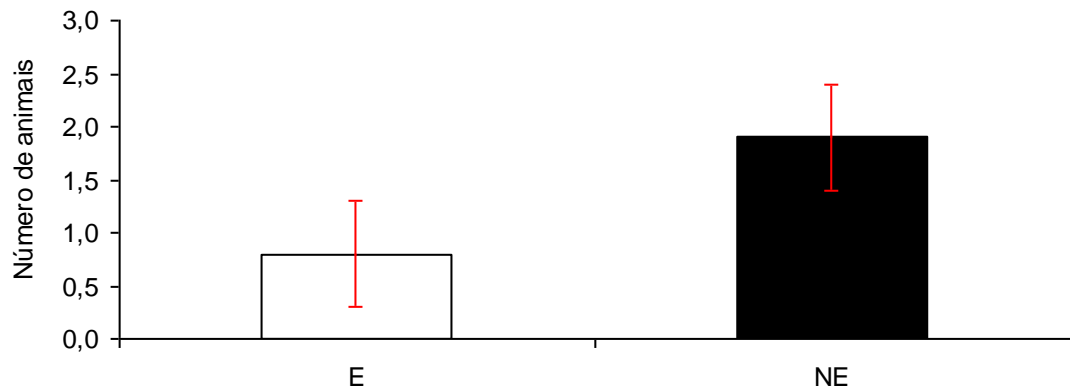


Figura 3. Mortalidade pré-desmama em ninhadas de camundongos endogâmicos *BALB/c* mantidas em gaiolas enriquecidas (E) e não enriquecidas (NE).

Detectou-se também efeito da idade de acasalamento sobre a mortalidade, que foi menor para os animais acasalados aos 28 dias de idade (Tabela 1 e Figura 4).

Mortalidade pré-desmame

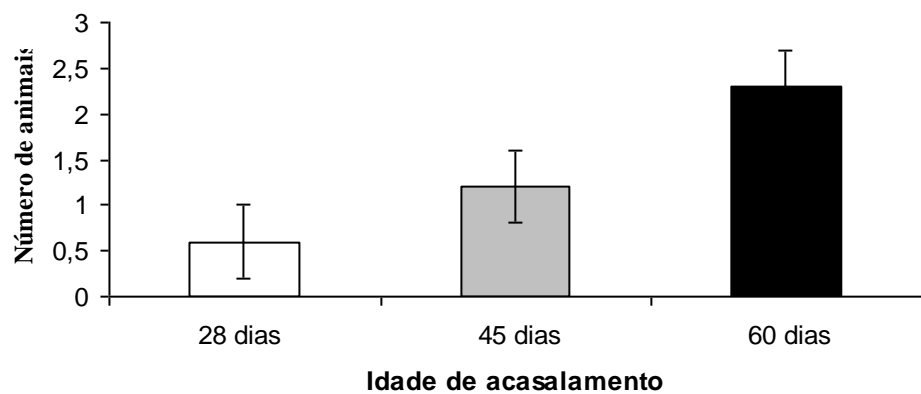


Figura 4. Mortalidade pré-desmama em ninhadas de camundongos endogâmicos *BALB/c* acasalados aos 28, 45 e 60 dias de idade.

Houve efeito também da ordem de parição sobre a característica mortalidade ($P= 0,01$), com queda acentuada do primeiro para o segundo parto (Figura 5).

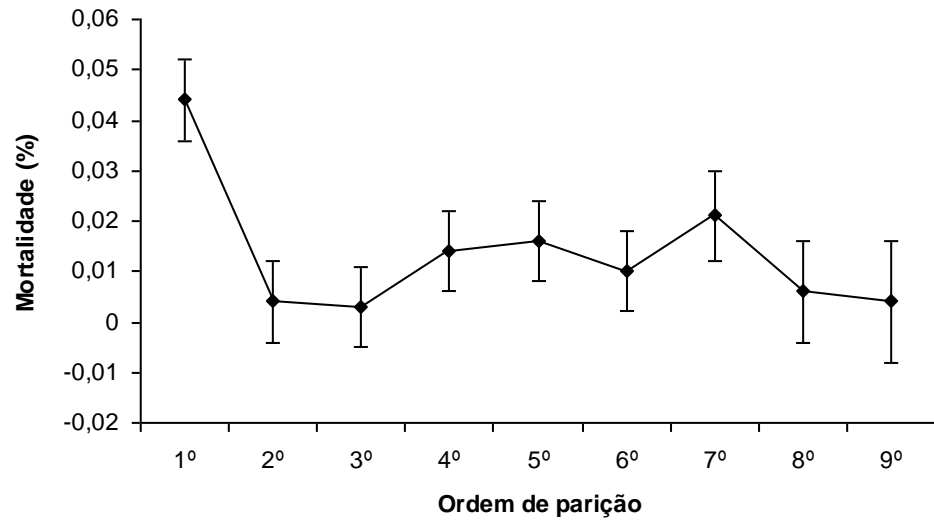


Figura 5. Taxa de mortalidade pré-desmama em camundongos endogâmicos *BALB/c* de acordo com a ordem de parição.

Entre os três grupos (28, 45 e 60) observados durante o período reprodutivo de nove partos, metade das fêmeas acasaladas aos 60 dias alcançaram o nono parto, 45 % no grupo 45 e apenas 25 % do grupo 28 (Figura 6).

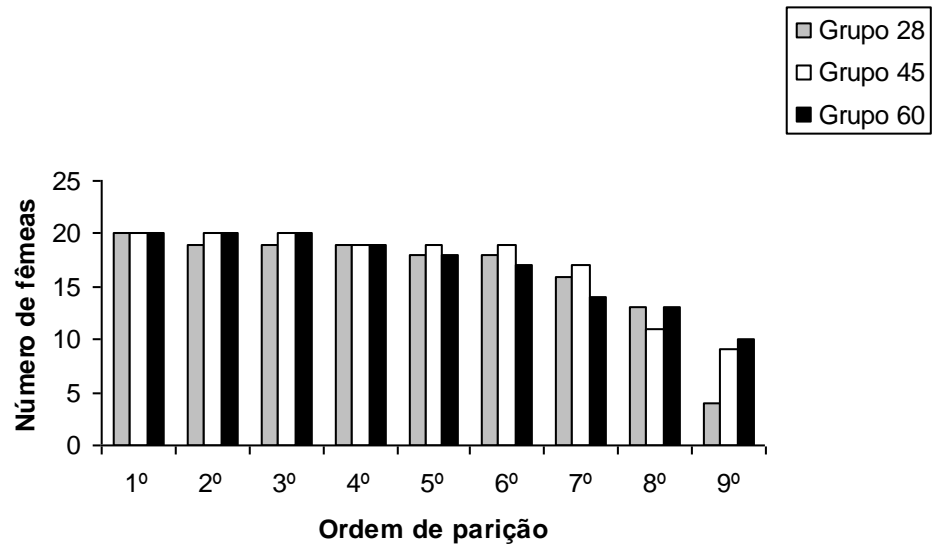


Figura 6. Número de fêmeas acasaladas de acordo com a ordem de parição em camundongos endogâmicos *BALB/c*, em diferentes idades de acasalamento, alojados em ambiente enriquecido ou não.

Não se detectou diferença entre tratamentos para a idade ao primeiro parto (Tabela 1).

Com relação ao peso médio da ninhada ao nascer, à desmama e aos 28 dias de idade, não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 2). A ordem de parição apresentou efeito sobre o peso médio da ninhada à desmama ($P = 0,0004$) e aos 28 dias ($P = 0,007$), e sobre o ganho de peso médio diário do nascimento até a desmama ($P = 0,0012$): figuras 7 e 8, respectivamente.

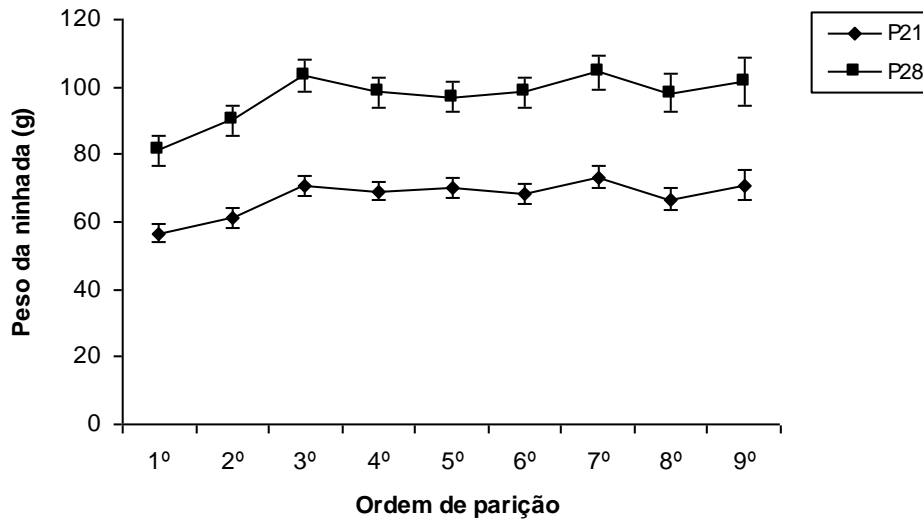


Figura 7. Peso da ninhada aos 21 e 28 dias de idade, de acordo com a ordem de parição, em camundongos endogâmicos *BALB/c* em diferentes idades de acasalamento, alojados em ambiente enriquecido ou não.

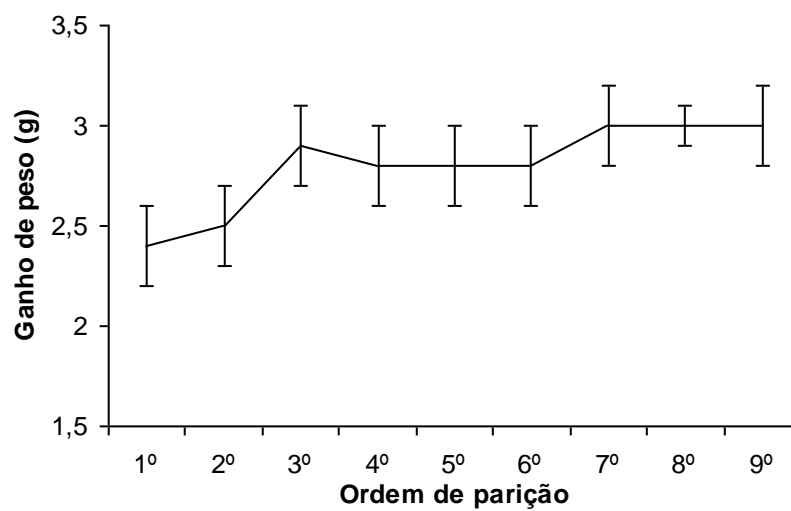


Figura 8. Ganho de peso médio diário do nascimento à desmama, de acordo com a ordem de parição, em camundongos endogâmicos *BALB/c* em diferentes idades de acasalamento, alojados em ambiente enriquecido ou não.

Discussão

Os casais apresentaram fertilidade igual a 100%, pois todas as fêmeas engravidaram mais de uma vez, independentemente da idade de acasalamento ou do ambiente a que foram submetidas.

Do número inicial de fêmeas, 61,7 e 40% alcançaram o oitavo e nono partos, respectivamente. Apenas 6,7% chegaram ao décimo parto (Figura 1), sendo que a metade dessas fêmeas não desmamou a ninhada em peso compatível com a idade. Segundo Inglis, (1988) a fêmea de camundongo deve ficar em reprodução por, aproximadamente, nove meses, embasando o encerramento do experimento aos trezentos e dez dias. Para a determinação da duração do ciclo de vida útil reprodutiva foi considerado o número de fêmeas por parto ao longo do período citado.

Como esperado, a duração do ciclo (DC) diferiu ($P = 0,03$) entre as idades de acasalamento. O ciclo do grupo acasalado aos 28 dias foi mais longo, o do acasalado aos 45 dias foi intermediário e o acasalado aos 60 dias foi mais curto (Tabela 1).

Houve aumento no número de desmamados do primeiro até o terceiro partos e a partir do quarto parto ocorreu uma alternância (uma ninhada um pouco menor e outra um pouco maior), de tal forma que nas ordens ímpares as fêmeas desmamaram mais filhotes que nas ordens pares de parição (Figura 2). Estes resultados sugerem que o tamanho da ninhada é influenciado pelo tamanho da ninhada anterior. Segundo Stabenfeldt e Edqvist (1996), há aumento da taxa de ovulação para as fêmeas em melhores condições corporais. O camundongo é uma espécie que apresenta cio pós-parto e quando explorado no sistema intensivo de produção, pode apresentar um desgaste energético alto, uma vez que a lactação e a gestação podem ocorrer, simultaneamente, em condições normais de fertilidade. Moura (2009), afirmou que as unidades feto-placenta e as glândulas mamárias usam, como fonte de energia, os mesmos substratos (glicose, ácidos graxos de cadeia longa e ácidos graxos livres). Concluiu que a

simultaneidade da gestação e lactação ocasiona uma competição entre o útero e a glândula mamária pelo suprimento de nutrientes, que poderá influenciar o desenvolvimento e a sobrevivência fetal. Nesse quadro, a fêmea pode apresentar condição corporal variável ao longo dos partos, influenciando no número de desmamados.

Detectou-se efeito do enriquecimento (Figura 3) e da idade de acasalamento (Figura 4) sobre a mortalidade pré-desmama (M), tanto a total (Tabela 1), como a média por ninhada (Tabela 2). Esses resultados sinalizam a influência do enriquecimento ambiental no comportamento materno. Este comportamento é desencadeado por diversos mecanismos hormonais, dentre eles a elevação de ocitocina que ocorre durante o parto; elevação de prolactina e estradiol e queda de progesterona (Bridges et al., 1997; Numan et al., 1999). Quaisquer fatores que alterem a dinâmica desses processos podem provocar alterações de comportamento.

É aceito por vários autores (Francis & Meaney, 1999; Champagne et al. 2003; McFarland, 2008), que o cuidado materno é um comportamento que se desenvolve, em maior ou menor grau, de acordo com influências genéticas e ambientais, incidindo diretamente na sobrevivência dos filhotes. Segundo Francis & Meaney (1999), diferenças individuais no comportamento maternal são transmitidas da fêmea para sua prole. Champagne et al. (2003), observaram que os perfis comportamentais são passados de geração para geração e são facilmente manipuláveis por fatores ambientais. Neste caso, os animais estudados apresentavam alto grau de endogamia, ou seja, eram muito semelhantes geneticamente, descartando-se a influência genética como diferencial no desenvolvimento do cuidado materno.

Comportamento parental é todo comportamento dos pais em relação à prole, que aumenta a probabilidade de sobrevivência dos filhotes (Trivers, 1972; Snowdon e Soni, 1982; Clutton-Brock, 1991). Ressalta-se o comportamento materno porque os filhotes de camundongos são muito dependentes da mãe, e a participação do pai como cuidador é rara (Brown, 1998; Vieira, 2003). Os recém nascidos de camundongos têm capacidades sensoriais limitadas, são incapazes de ver, ouvir e se locomover de modo coordenado. Não conseguem

regular a temperatura e se alimentar sozinhos (Vieira, 2003). Assim sendo, devido a sua fragilidade, necessitam de intensos cuidados maternos para seu desenvolvimento e sobrevivência. O ato de confeccionar o ninho é uma importante etapa do comportamento materno, na medida em que permite o agrupamento dos filhotes, intensificando o contato mãe-filhote, facilitando os cuidados empregados pela mãe (Fleming et al, 1999). O ato de lambe os filhotes, por exemplo, além de mantê-los limpos (Brown, 1998), tem a função de estimular a defecação e a micção nos primeiros dias de vida (Brouette-Lahlou et al., 1998). O controle térmico da ninhada também é facilitado pelo agrupamento dos filhotes. Na natureza, os camundongos utilizam pelos e plantas como material para confecção de ninhos (Alcock, 1993); logo, o material utilizado influenciará na qualidade do ninho. De acordo com os resultados obtidos no experimento, o uso de tubos de papelão como material para nidificação funcionou de maneira satisfatória, estimulando o cuidado materno; o que refletiu na baixa mortalidade encontrada no grupo enriquecido.

Com relação ao efeito da idade ao acasalamento sobre a mortalidade pré-desmama, os resultados parecem indicar que quanto mais tardio o acasalamento, maior a mortalidade, tendo em vista que ela foi menor no grupo acasalado aos 28 dias, intermediária no grupo acasalado aos 45 dias e maior no grupo acasalado aos 60 dias. Este resultado não era esperado devido a imaturidade das fêmeas do grupo 28, o que instiga maior reflexão. Nos biotérios, é quase um dogma a questão do acasalamento precoce em camundongos isogênicos. Acredita-se, realmente, que as fêmeas acasaladas nessa idade parem muito jovens e por isso esperava-se que nesse grupo ocorresse a maior mortalidade, com alto índice de canibalismo e abandono das crias, o que não foi observado.

O estresse pós-desmama, no grupo acasalado aos 28 dias, pode ter sido minimizado pela formação e manutenção dos casais de irmãos logo após o desmame, criando uma estabilidade no ambiente, que acabou por repercutir favoravelmente na vida reprodutiva dos mesmos, mais estáveis emocionalmente. Diferentemente, os animais dos grupos 45 e 60, foram agrupados

formando grupos homossexuais, desde a desmama até a idade de acasalamento. A densidade populacional nesse período foi variável, mas não houve superpopulação (máximo de cinco filhotes por caixa) e nunca um animal esteve sozinho. Logo, não houve condições geradoras de comportamentos de estresse e ansiedade, que pudessem refletir na vida adulta reprodutiva, influenciando a mortalidade dos filhotes. Nesta segunda situação (45 e 60), apesar de estarem entre irmãos, necessitaram estabelecer a dominância do novo grupo e lidar com questões de competição. Essa situação, além de ser totalmente artificial, já não representava mais o grupo de origem do indivíduo (pais e irmãos), o que pode ter gerado comportamentos instáveis que se agravaram com o tempo. No caso das fêmeas, esta instabilidade pode ter gerado a ansiedade e a hiperatividade, por exemplo, influenciando a qualidade do ninho e os cuidados maternos, diminuindo o tempo gasto com a construção e manutenção do ninho e da ninhada. Nos machos observa-se que a dominância parece ser conquistada através de lutas.

A ordem de parição também apresentou efeito sobre a característica mortalidade ($P=0,01$), com queda acentuada do primeiro para o segundo parto (Figura 5). Pode ser atribuída à imaturidade da fêmea no primeiro caso, e ao melhor desempenho em lactação, a partir do segundo parto. Segundo Park e Jacobson (1996), a involução mamária, que se caracteriza por diminuição no número de células epiteliais e também na atividade por célula, têm aproximadamente 50% dessas células conduzidas de uma lactação para outra. Este fato sugere que talvez a produção de leite possa estar mais intimamente associada a gestações sucessivas do que com a idade.

Ao comparar o período reprodutivo observado em nove partos, entre os três grupos (28, 45 e 60), metade das fêmeas acasaladas aos 60 dias alcançaram o nono parto, 45 % no grupo 45 e apenas 25 % do grupo 28 (Figura 6). Este fato evidencia um melhor desempenho das fêmeas do grupo 28, visto que não houve diferença no número de desmamados totais, o que sugere que esse grupo apresentou ninhadas maiores, que talvez possa ter sido devido a fatores como: melhor produção de leite, habilidade materna e estabilidade emocional.

A idade ao primeiro parto não diferiu entre os tratamentos (Tabela 1). Estes resultados indicam que esta variável independe da idade do acasalamento, diferentemente do que se esperava. O acasalamento precoce, antes da maturidade sexual, resultou em idade ao primeiro parto por volta dos 90 dias, semelhante à alcançada pelas fêmeas acasaladas pós-maturidade sexual dos demais grupos (45 e 60). Portanto, neste caso, observa-se que o acasalamento precoce não implicou em prenhez precoce, que poderia comprometer o desenvolvimento físico e a vida reprodutiva das fêmeas. Este dado torna-se de grande importância para a criação de camundongos isogênicos, uma vez que, nos biotérios nacionais se recomenda o acasalamento precoce (à desmama), como forma de assegurar o padrão genético dos animais, apesar de não haver dados na literatura que respaldem essa prática.

A ordem de parição apresentou efeito sobre o peso médio da ninhada à desmama ($P = 0,0004$) e aos 28 dias ($P = 0,007$), e sobre o ganho de peso médio diário do nascimento até a desmama ($P = 0,0012$). A figura 7 indica aumento nos pesos das ninhadas desmamadas aos 21 dias, do primeiro até o terceiro parto. Entre o quarto e o sétimo parto observa-se que o peso à desmama permaneceu praticamente inalterado. No oitavo e nono partos as oscilações já podem ter ocorrido devido ao menor número de fêmeas que atingiram estas ordens de parição. Para as ninhadas pesadas aos 28 dias de idade, observa-se a mesma distribuição ao longo das ordens de parição, quando comparadas ao peso dos 21 dias. O ganho médio de peso diário das ninhadas, do nascimento à desmama, apresentou uma ascendência do primeiro ao terceiro parto e, a partir deste, sem grandes oscilações até o nono parto (Figura 8).

O intervalo médio entre partos mostrou-se dentro do esperado para camundongos isogênicos, sem diferença entre os grupos. O número médio de dias para produzir um filhote desmamado não diferiu, tanto em relação ao enriquecimento quanto às idades de acasalamento (Tabela 2).

Conclusão

As três idades de acasalamento apenas diferiram entre si para a característica mortalidade pré-desmama. Uma vez que o acasalamento aos 28 dias não comprometeu a vida útil reprodutiva, pode-se então, recomendar esta idade como uma prática cientificamente comprovada. Facilitar-se-á assim, o fluxo de produção nos biotérios, assegurando a isogenicidade da colônia e a preservação do patrimônio genético de camundongos *BALB/c*.

A isogenia impõe algumas limitações à produção. Nesse cenário, o enriquecimento do ambiente com tubos de papelão contribuiu para o aumento da produtividade da linhagem de camundongos isogênicos *BALB/c*, na medida em que diminuiu a mortalidade pré-desmama.

A necessidade de produzir cada vez mais e melhor não deve impor aos animais sofrimentos desnecessários. Pode-se e deve-se produzir com respeito e ética no cuidado aos seres sencientes, priorizando sempre o bem-estar. Portanto, justifica-se a adoção imediata de medidas que beneficiem a saúde física e psicológica deles.

Referências

ALCOCK, J. **Animal behavior: an evolutionary approach**. 5 th ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1993.

ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E.; TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP, 2004.

BRIDGES, R. S.; ROBERTSON, M. C.; SHIU, R. P.; STURGIS, J. D.; HENRIQUEZ, B. M.; MANN, P. E. Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. **Endocrinology**, v. 138, n. 2, p. 756-763, 1997.

BROUETTE-LAHLOU, I.; GODINOT, F.; VERNET-MAURY, E. The mother rat's vomeronasal organ is involved in detection of dodecil propionate, the pup's preputial gland pheromone. **Physiology & Behavior**, v. 66, n. 3, p. 427-436, 1998.

BROWN, R. E. Influências da experiência prévia e hormônios no comportamento paterno de roedores: uma abordagem integrativa. In: COSTA, M. J. R. P.; CROMBERG, V. U. (Ed.). **Comportamento materno em mamíferos: bases teóricas e aplicações aos ruminantes domésticos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Etologia, 1998. p. 115-160.

CHAMPAGNE, F. A.; FRANCIS, D. D.; MAR, A.; MEANEY, M. J. Variations in maternal care in the rat as mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology and Behavior**, v. 79, n. 3, p. 359-371, 2003.

CLUTTON-BROCK, T. H. **The evolution of parental care**. Princeton: Princeton University Press, 1991.

FLEMING, A. S.; O DAY, D. H.; KRAEMER, G. W. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 673-685, 1999.

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V. L. L.; RIVERA, E. A. B. Ciência em animais de laboratório. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 44-46, 2008.

FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care and the development of stress responses. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 9, n. 1, p. 128-134, 1999.

GUIDELINES for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. In:_____. **Anesthesia and Analgesia**. Washington, D.C.: Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research; The National Academies Press, 2003. Pt. 2, p. 104.

INGLIS, J. K. (Ed.). **Reproduction, breeding , and heredity**. Oxford: Introduction to Laboratory Animal Science & Tecnology; Pergamon Press, 1988. p. 156-229.

MATTARAIA, V. G. M. Enriquecimento ambiental. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. (Ed.). **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 537-547.

MCFARLAND, A. M. **The influence of natural variations of maternal care on the emotional and behavioral reactivity of offspring in the rodent model**. Ohio: Bowling Green State University, 2008. p. 115.

MOURA, A. S. A. M. T. Coelho. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. (Ed.). **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p 187-211.

NUMAN, M.; ROACH, J. K.; DEL CERRO, M. C.; GUILLAMON, A.; SE GOVIA, S.; SHEEHAN, T. P.; NUMAN, M. J. Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. **Brain Research**, v. 830, n. 2, p. 358-371, 1999.

PARK, C. S.; JACOBSON, N. L. Glândula mamária e lactação. In: DUKES, H.H. (Ed.). **Fisiologia dos animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1996. p. 645-659.

SNOWDON, C. T.; SONI, S. J. Parental behavior in primates. In: FITZGERALD, H. E.; MULLINS, J. A.; CAGE, P. (Ed.). **Child nurturance**. New York: Plenum Press, 1982. p. 63-108.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E. Endocrinologia reprodução e lactação. In: DUKES, H.H. (Ed.). **Fisiologia dos animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1996. p. 615-644.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. Release 9.1.3 Service Pack 2. Cary: SAS Inst. Inc. 2003.

TRIVERS, R. L. Parental investment and sexual selection. In: CAMPBELL, D. (Ed.). **Sexual selection and descent of man**. Chicago, USA: Aldine, 1972. p. 136-179.

VAN DE WEERD, H. A.; BAUMANS, V. Environmental enrichment in rodents. **AWIC Resource Series**, v. 2, p. 145-149, 1995.

VIEIRA, M. L. Comportamento materno e paterno em roedores. **Biotemas**, v. 16, p. 159-180, 2003.

CAPÍTULO 3

Implicações

Hoje produzimos animais com padrão genético e sanitário adequado à pesquisa e aos processos de produção de fármacos e imunobiológicos. Mas não bastam as instalações modernas e boas praticas de fabricação, é preciso conhecer as etapas de produção, o animal e seus processos biológicos, bem como o seu estado psicológico. Só assim, podemos estabelecer técnicas de manejo eficientes que melhorem os índices produtivos. Os resultados obtidos neste experimento permitem a consolidação da prática do acasalamento precoce em camundongos isogênicos *BALB/c*, agora baseado em resultados científicos, e não mais em observações empíricas.

A metodologia utilizada no experimento, aponta como único diferencial entre os grupos, a maior permanência dos animais acasalados aos 45 e aos 60 dias de idade, nas caixas de estoque em arranjos homossexuais, como descritos no item material e métodos. O estabelecimento da relação idade de acasalamento e sua influencia na mortalidade pré desmama, bem como a questão da condição de homossexualismo a que foram submetidos os animais que aguardaram a idade de acasalamento e a provável interferência na vida reprodutiva futura, denotam a necessidade de desenvolvimento de mais estudos que corroborem e aprofundem os resultados obtidos durante esta pesquisa.

Tão importante quanto o conhecimento científico acerca do manejo reprodutivo, é o reconhecimento da senciência desses animais e a utilização de técnicas de enriquecimento do ambiente, que permitam ao animal manifestar os comportamentos característicos da espécie, minimizando a provável condição de estresse em cativeiro. Além de correto eticamente, a adoção de tubos de papelão como forma de enriquecimento do ambiente para camundongos em sistema intensivo de produção, mostrou-se surpreendentemente favorável à melhora dos índices produtivos, ao estimular o comportamento materno e diminuir a mortalidade pré desmama.