

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

**EFICIÊNCIA REPRODUTIVA E COMPORTAMENTO PARENTAL
DE CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS E HETEROGÊNICOS
PRODUZIDOS EM AMBIENTE MODIFICADO**

VIRGÍNIA BARRETO MOREIRA

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

BOTUCATU - SP
Junho – 2015

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

**EFICIÊNCIA REPRODUTIVA E COMPORTAMENTO PARENTAL
DE CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS E HETEROGÊNICOS
PRODUZIDOS EM AMBIENTE MODIFICADO**

VIRGÍNIA BARRETO MOREIRA

Zootecnista

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

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

BOTUCATU - SP
Junho – 2015

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

Moreira, Virgínia Barreto, 1974-

M838e Eficiência reprodutiva e comportamento parental de camundongos isogênicos e heterogênicos produzidos em ambiente modificado / Virgínia Barreto Moreira - Botucatu : [s.n.], 2015
ii, 106 f. : fots. Color. ,tabs. ,grafs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu 2015

Orientador: Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura
Inclui Bibliografia

1. Camundongo como animal de laboratório - Reprodução
2. Animais - Proteção. 3. Animais - Experimentação. 4. Produção animal. 5. Avaliação de comportamento. I. Moura, Ana Silvia Alves Meira Tavares. II. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. 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 e a todos os familiares que torceram muito para que esse sonho se realizasse.

A todos 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 e a Dra. Vânia Gomes de Moura Mattaraia, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, dedicação, empenho e incentivo para o desenvolvimento desse trabalho.

A todo corpo técnico do Biotério Central do Instituto Butantan pelo apoio recebido, em especial a Cynthia Zaccanini de Albuquerque e Mariana Valotta Rodrigues pela firme vontade de fazer com que tudo desse certo e por me darem força nos momentos mais difíceis. Aos funcionários do setor de camundongos isogênicos e heterogênicos Ana Maria Braga, Alex Alves Rodrigues, Allan Calarga e Élio da Silva pela dedicação.

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 doutorado que me receberam com muito carinho.

Aos professores que participaram da banca de Qualificação e Defesa, Dra. Simone Fernandez, Dr. Paulo Sérgio Teixeira, Dra. Valderez Bastos Valero Lap – Chik, Prof. Dra. Assist. Denise Rangel da Silva Sartori e Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pelas sugestões e correções, que sem dúvida enriqueceram o trabalho.

Aos funcionários da seção de pós-graduação Seila Cristina Cassineli Vieira, Carlos Pazini Junior e Ellen Guilhen, sempre eficientes e prestativos, e a Bibliotecária Ana Lúcia Kempinas pela eficiência e atenção.

SUMÁRIO

	Página
CÁPITULO I	
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
Referências	23
CÁPITULO II	
EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS E HETEROGÊNICOS PRODUZIDOS EM AMBIENTE MODIFICADO PELO FORNECIMENTO DE MATERIAL PARA NIDIFICAÇÃO.	36
Resumo	37
Abstract	39
Introdução	41
Materiais e Métodos.....	43
Resultados	47
Discussão	55
Conclusão.....	65
Referências	67
CÁPITULO III	
COMPORTAMENTO PARENTAL DE CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS E HETEROGÊNICOS SUBMETIDOS À MODIFICAÇÃO AMBIENTAL COM O FORNECIMENTO DE MATERIAL PARA NIDIFICAÇÃO.	73
Resumo	74
Abstract	76
Introdução	78
Materiais e Métodos.....	80
Resultados	85
Discussão	92
Conclusão.....	98

Referências	100
CÁPITULO III	
IMPLICAÇÕES	105

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Histórico

Desde que começaram a ser realizados estudos com animais de laboratório até os dias de hoje, muitos estudos foram realizados, não só com estes animais, como também com os métodos utilizados em sua criação (MAGALHÃES, 2009). Anteriormente à era contemporânea, os animais de laboratório eram utilizados como simples "instrumentos de trabalho", auxiliando na investigação do diagnóstico de diferentes doenças, sem levar em consideração sua condição sanitária e genética. Com o avanço da Ciência, essas condições tornaram-se exigências, levando à criação de uma autêntica especialidade, a "Ciência em animais de laboratório" (FERREIRA et al., 2005). Atualmente, os animais de laboratório são considerados reagentes biológicos e como tal devem se enquadrar em padrões de qualidade sanitária e genética que permitam sua utilização com confiabilidade e reprodutibilidade de resultados.

A ampliação e o aprimoramento da pesquisa em animais deve-se, em parte, à profissionalização dos biotérios de produção. Para o desenvolvimento de modelos animais adequados à pesquisa científica, bem como para a produção de imunobiológicos foi necessário investir na produção de animais geneticamente definidos obtidos pela manipulação de seus genes, através de técnicas de engenharia genética e sistemas de acasalamento. Paralelamente investiu-se na estrutura física e tecnológica dos biotérios, visando à produção de animais de qualidade sanitária,

Segundo Brooks et al. (2005) os resultados obtidos em pesquisas feitas com animais definidos quanto ao padrão genético e sanitário, são a base de importantes conhecimentos da medicina moderna, contribuindo enormemente para a saúde e bem-estar da população humana. A experimentação animal trouxe a possibilidade de humanos e animais viverem melhor e por mais tempo. Entre os benefícios da experimentação animal podemos citar a descoberta de doenças e de medidas profiláticas e tratamentos, o desenvolvimento de vacinas e produção de soros, de técnicas de transplantes de órgãos, de drogas, tranquilizantes, anestésicos e anti-depressores entre outros. Note-se que 70% dos cientistas que ganharam o prêmio Nobel na área de Fisiologia e Medicina usaram diretamente modelos animais em seus estudos

(*MEDICAL ADVANCES AND ANIMAL RESEARCH*, 2014). Desta forma, o amplo uso dos animais de laboratório como matéria-prima biológica quer seja na experimentação biomédica, quer seja na produção de imunobiológicos, atendendo às normativas da Organização Mundial da Saúde, demonstra a sua importância e os tornam essenciais para alicerçar o conhecimento advindo das pesquisas científicas. Apesar de todo o desenvolvimento tecnológico atual, ainda não há nada que substitua completamente os animais em experimentação.

A grande dificuldade está em simular a complexidade de um organismo biológico com suas reações bioquímicas e as interações entre os diferentes órgãos que compõem o sistema biológico. No caso da produção de imunobiológicos, por exemplo, mesmo quando o animal é substituído por testes *in vitro* durante o processo de produção, há necessidade de que sejam efetuados os testes de eficácia e segurança em animais após a finalização do produto para uso humano, seguindo as normas preconizadas pela Organização Mundial da Saúde e as Farmacopeias Brasileira, Americana e Europeia. Uma mesma substância pode agir em vários locais do organismo, de forma que efeitos em um processo biológico podem ter consequências inesperadas em outros.

Se por um lado há exigências quanto à qualidade e segurança dos produtos utilizados no público alvo, pelas agências reguladoras, por outro existe uma preocupação crescente dos pesquisadores com relação ao bem-estar dos animais submetidos aos seus cuidados durante o processo de experimentação. Neste sentido, em 1959, Willian Russel e Rex Burch deram um importante passo com a publicação “The principles of Humane Experimental Technique” onde buscaram trazer mais “humanismo” às técnicas de experimentação. O princípio dos 3 Rs como ficou conhecido, por sua grafia em inglês (Replacement, Reduction e Refinement) propõe a adoção de algumas medidas para o uso de animais em experimentação.

A primeira medida consiste em avaliar a possibilidade de substituição dos animais por métodos alternativos (desde que validados), ou a substituição por espécies de animais com sistema nervoso menos desenvolvido como, por exemplo, os invertebrados. Caso o uso de animais seja imperativo, a segunda medida indica a implantação de qualquer estratégia que resulte no uso de menor número de animais, desde que se obtenha a mesma quantidade de informações ou maximizando a informação obtida por animal. Isto poderia ocorrer com o uso de métodos estatísticos

adequados, que permitam inferir o resultado de uma amostra para uma população e evitando repetições desnecessárias através da melhoria das condições dos ensaios e da diminuição de variáveis que invalidem resultados como estresse e dieta. Por fim, o refinamento propõe a modificação de qualquer procedimento que seja efetuado (desde o nascimento do animal até a sua morte, o que inclui os biotérios de produção) diminuindo a dor e o sofrimento do animal através da escolha de métodos não invasivos, anestesia, analgésicos, métodos de eutanásia bem como o enriquecimento ambiental adequado a espécie.

Hoje, trabalhamos com regras e leis que dão contornos bem definidos às condutas dedicadas à criação e experimentação animal, embora ainda existam dificuldades (financeiras e comportamentais) em muitas instituições brasileiras em adotar os Princípios dos 3 Rs. Segundo Braga (2009) a saída para alcançarmos a boa ciência é investir na disseminação do conhecimento da Ciência dos Animais de Laboratório, que é multidisciplinar e que tem muito a contribuir com o uso consciente e humanitário dos animais na pesquisa biomédica.

Modelo Animal e Linhagens

Em 1902, quando muito pouco se conhecia sobre os fundamentos da Genética, Archibald Garrod descobriu que a alcaptonúria (doença genética rara) era consequência de uma desordem metabólica que se herdava de forma mendeliana simples (apud BENAVIDES E GUÉNET, 2003). A partir daí, muitas outras enfermidades humanas foram reconhecidas como resultado de um defeito na constituição genética dos indivíduos afetados. Paralelamente ao desenvolvimento do conhecimento sobre as patologias humanas, foram identificadas várias patologias semelhantes em animais. Estes “modelos” ajudaram enormemente na compreensão dos mecanismos de ação de muitas das enfermidades estudadas (BENAVIDES E GUÉNET, 2003).

Modelo animal pode ser definido como um produto experimental desenvolvido em determinada espécie com o propósito de estudar fenômenos que ocorrem em outra espécie (MCKINNEY, 1984; FERREIRA et al., 2005). Segundo Fagundes et al. (2004) um modelo deve ter características suficientes para ser semelhante ao objeto imitado e ter a capacidade de ser manipulado sem as limitações do objeto imitado. No caso de modelos animais de doenças humanas, eles se tornam válidos quando apresentam as

mesmas estruturas envolvidas no comportamento ou na patologia em estudo, ou seja, devem ser o mais semelhantes possível ao que se deseja estudar (KAPLAN, 1973; HOCHMAN et al., 2004; FAGUNDES et al., 2004; MASSIRONI, 2012). Geralmente, os modelos animais aparecem como resultado de mutações, espontâneas ou induzidas, que levam a uma alteração fenotípica em decorrência de um produto proteico não funcional ou ausente. Uma grande quantidade desses mutantes apresenta fenótipos que se assemelham fortemente àqueles observados em certas doenças humanas, podendo essas homologias se estender ao nível molecular (GODARD, 2008).

Segundo Benavides e Guénet, (2003) durante todos estes anos de uso dos animais de laboratório em pesquisa foram descritas mais de 1500 mutações espontâneas ou induzidas. Estes modelos são úteis fundamentalmente porque permitem identificar a base molecular de uma enfermidade, bem como sua fisiologia, além de permitir o desenvolvimento de novas terapias.

O desenvolvimento de drogas terapêuticas eficazes pode vir a ocorrer através do uso de modelos animais que desenvolvam patologias semelhantes às desenvolvidas em humanos, desde que se consiga identificar os alvos e as vias bioquímicas e fisiológicas envolvidas nos mecanismos de ação comuns à patologia estudada (MOORE, 1999). Entre as diferentes espécies animais utilizadas na experimentação biomédica, o camundongo é amplamente estudado (ANDERSEN et al., 2004; ABRAMOV et al., 2008; ARNDT et al., 2009; KOIKE et al., 2009).

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, além da similaridade biológica que o aproxima do ser humano. O sequenciamento completo do genoma de camundongos foi publicado em 2002. Depois do homem, o camundongo é o mamífero que possui o genoma mais bem estudado e conhecido (WATERSTON et al., 2002).

O camundongo e o homem compartilham aproximadamente 99 % de seus genes, o que os torna portadores das mesmas doenças mendelianas e poligênicas (AUSTIN et al., 2004; MASSIRONI, 2012). Para Benavides e Guénet (2003) a observação da segregação de polimorfismos de várias classes é possível devido à grande quantidade de

marcadores genéticos e de mutações (obesidade, anemia, distúrbios metabólicos entre outras) já isoladas nesta espécie, aliados à possibilidade de se obterem proles viáveis e férteis. O modelo murino que apresenta distrofia muscular ligada ao cromossomo X decorrente de uma mutação espontânea no gene *MDX*, por exemplo, leva os animais a apresentar níveis elevados de creatina quinase e piruvato quinase no plasma. O locus *mdx* se mostrou homólogo ao gene que codifica a distrofina. No homem, mutações nesse gene podem levar à Distrofia Muscular de Duchenne ou Becker. Segundo Godard (2008) esses mutantes foram de extrema importância porque permitiram a demonstração de que a falta de distrofina era a principal causa da doença humana.

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.

O estudo formal da genética de camundongos teve seu início com o estabelecimento da primeira linhagem isogênica (DBA), no começo do século XX. Em 1915, Haldane publicou o primeiro mapa genético do camundongo (apud MASSIRONI, 2012). Do ponto de vista genético, há dois grandes grupos de camundongos utilizados em pesquisa e na produção de imunobiológicos: não endogâmicos ou heterogênicos e endogâmicos ou isogênicos. Os primeiros são derivados de acasalamentos não

consanguíneos, apresentando, portanto, alta heterozigose. Este grupo é o que melhor representa a variabilidade genética de uma população humana. Segundo Chia et al (2004) os camundongos heterogênicos podem ser definidos como uma população fechada (pelo menos 4 gerações) de animais de genética variável, criados para manter a máxima heterozigose (o incremento do coeficiente de endogamia deve ser menor que 1 % a cada geração). Para que o índice de endogamia permaneça abaixo de 1% deve-se utilizar sempre o acasalamento de animais sem parentesco entre si, o que pode ocorrer através da implantação de métodos controlados de acasalamentos randômicos (POILEY, 1960; RAPP, 1972; GUÉNET E BENAVIDES, 2003).

Os primeiros registros do camundongo *Swiss* são do Instituto Pasteur, de Paris, antes de 1920. Alguns exemplares desses animais foram cedidos à Suíça (origem de seu nome) e posteriormente, deram origem a outras linhagens como o CD-1 (RICE; O'BRIEN, 1980; BENAVIDES E GUÉNET, 2003). São utilizados em grande quantidade nos testes pré-clínicos para a indústria farmacêutica e na produção de imunobiológicos. Também são muito requisitados para pesquisas ligadas a variabilidade genética, embora seu uso esteja sendo questionado por alguns pesquisadores. Benavides e Guénet, (2003), por exemplo, sustentam que se poderia obter maior variabilidade genética utilizando-se um conjunto de linhagens isogênicas, ou gerando essa variabilidade através da produção de híbridos F₁ obtidos pelo cruzamento de duas linhagens isogênicas distantes, como, por exemplo, no cruzamento das linhagens *AKR* x *BALB/c* ou *C₃H* x *DBA* e posteriormente cruzando-os entre si. Segundo os autores, nestes processos de cruzamento, o polimorfismo gerado é muito alto e se aproxima das populações humanas. Para Chia et al. (2004) a substituição de camundongos heterogênicos por um conjunto de linhagens isogênicas é viável e poderia conferir mais segurança na interpretação dos resultados obtidos, uma vez que os animais heterogênicos não são definidos geneticamente.

Os endogâmicos são animais resultantes de pelo menos 20 gerações consecutivas de acasalamentos entre irmãos completos, gerando um índice de homozigose de 99%. A grande vantagem de utilização das linhagens isogênicas é a uniformidade genética que acaba por eliminar esta variável na interpretação dos resultados experimentais (BENAVIDES E GUÉNET, 2003). 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. Posteriormente, outros pesquisadores repetiram o processo de acasalamentos consecutivos de irmãos completos por 20 gerações com o objetivo de produzir novas linhagens isogênicas, como por exemplo, *BALB/c* e *C57Bl/6*.

As linhagens isogênicas apresentam características que as diferem umas das outras e, ao mesmo tempo, uniformidade fenotípica e genética entre os indivíduos de uma mesma linhagem, o que implica em variações experimentais restritas a fatores externos sem a influência da genética do animal (KNIGHT E ABBOT, 2002; BENAVIDES et al., 2004). Assim, cada linhagem isogênica tem um leque de características particulares como o tipo de tumores espontâneos, produção de leite, habilidade para aprender, agressividade, susceptibilidade a agentes infecciosos, entre outras, que tornam a sua escolha essencial para o desenho experimental e para a obtenção de resultados confiáveis (BENAVIDES E GUÉNET, 2003).

A pressão constante da comunidade científica, ávida por modelos animais de doenças humanas cada vez mais específicos, resultou em reagentes biológicos cada vez mais puros. Segundo Lynch (1969) uma linhagem só pode ser considerada pura se for formada por uma população de indivíduos geneticamente idênticos e homozigóticos.

Nas últimas décadas, diferentes linhagens de camundongos transgênicos (quando há acréscimo de genes clonados ou de fragmentos de DNA nos cromossomos) e *knockout* (quando ocorre a inativação de genes conhecidos) 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) e cerca de 500 diferentes linhagens de camundongos isogênicos (KO, 2009).

A linhagem *BALB/c* é a mais popular dentre as linhagens isogênicas, devido, principalmente, ao seu uso na produção de anticorpos monoclonais (BENAVIDES E GUÉNET, 2003) e por seu temperamento hiperativo, caracterizado por alta ansiedade

(BOLEIJ et al., 2012) e melhor desempenho reprodutivo, quando comparada a outras linhagens isogênicas de difícil produção.

Características físicas e comportamentais

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, a Grécia e a Turquia (BENAVIDES E GUÉNET, 2003). 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).

Os filhotes nascem com pele avermelhada (linhagens albinas), desprovida de pelos, com exceção das vibrissas (órgãos de tato altamente sensitivos). Possuem olhos e pavilhões auriculares fechados e orelhas coladas à cabeça, com peso ao nascer entre 1,0 a 1,5 g. Devido à pele fina e à 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 já está completamente envolto na pelagem característica da linhagem. A orelha se despreza 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, quando apresentam peso entre 10g e 12 g, de acordo com o tamanho da ninhada e o padrão genético (MOREIRA et al., 2005).

As fêmeas são poliéstricas 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 à 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. Apresentam hábitos noturnos, e comportamentos característicos da espécie muito expressivos como a confecção de ninho e o alojamento em tocas (ALCOCK, 1993; GALLEF et al., 1993; SUCKOW et al., 2001). No entanto, os acasalamentos seletivos e a manipulação genética geraram linhagens com características fenotípicas e genéticas distintas, que promoveram gradações em alguns destes comportamentos, como por exemplo, diferenças na complexidade da construção dos ninhos e tocas para as linhagens isogênicas *BALB/c*, *C57BL/6* e *DBA* (DUDEK et al., 1983; TARANTINO et al., 2000; BOND et al., 2002).

O comportamento de agressão também apresenta variações entre as diferentes linhagens sendo que os camundongos *DBA* e *Swiss* são considerados bons modelos para o estudo das causas e mecanismos da agressão (FERRARI et al., 1996; CRAWLEY et al., 1997; LOO et al., 2004) enquanto a linhagem *ABG* é considerada de temperamento dócil (MARASHI et al., 2004). As lutas consistem em morder o adversário no dorso e na base da cauda e, muitas vezes, são severas. Normalmente, ocorrem entre machos adultos agrupados em espaços pequenos, enquanto machos agrupados logo após o desmame geralmente coexistem pacificamente na mesma gaiola (KO, 2009). Entre as fêmeas, as brigas são incomuns e, quando ocorrem, normalmente é para defesa da ninhada contra intrusos (ELWOOD et al., 1990; MAESTRIPIERI e ALLEVA, 1990; e WOLFF PETERSON, 1998). O comportamento protetor, com aumento da agressividade das fêmeas contra os invasores para defesa da cria, é bem descrito na literatura.

Segundo Weber e Olsson (2008) machos e fêmeas demonstram comportamento parental. No entanto, muitas vezes, membros da mesma espécie são os potenciais

predadores dos filhotes. Neste cenário, as fêmeas prenhas ou lactentes assumem comportamento agressivo para proteger o ninho e os filhotes contra possíveis ataques. Entretanto, existe um comportamento mais comum entre as fêmeas conhecido como *Barbering* ou Barbeamento que se constitui de uma perda local de pelos (geralmente na face), sem feridas e com uma margem bem definida entre as áreas sem pelo e com pelo normal, em que o camundongo dominante, que infringe aos subordinados esta ação de *Barbering*, não apresenta perda de pelos (BENAVIDES E GUÉNET, 2003; KO, 2009).

Vários transtornos relacionados à ansiedade são considerados patologias e normalmente envolvem comportamentos de defesa (ZANGROSSI e GRAEFF, 2004). Assim, os camundongos são considerados bons modelos animais de ansiedade, porque expressam comportamentos defensivos frente a situações de perigo ou a estímulos aversivos, que contribuem para a identificação e compreensão dos circuitos neuronais envolvidos nestes processos (BLANCHARD et al., 1993).

Os testes usados para aferição da ansiedade em animais podem ser os modelos de condicionamento ou etológicos. Os primeiros são questionados por utilizarem a punição como condicionamento (choque elétrico, privação de água ou alimento entre outros) com potencial para gerar, por exemplo, estados motivacionais de dor, que poderiam interferir nos resultados do experimento. Os etológicos usam as reações naturais de defesa de animais expostos a estímulos naturalmente aversivos (PELLOW, 1985; GRAEFF, 2005). Segundo Graeff (2005) o modelo mais utilizado tanto para testes farmacológicos quanto comportamentais é o labirinto em cruz elevado que tem seu fundamento na aversão natural de camundongos e ratos a espaços abertos. A aferição da ansiedade neste modelo inclui a avaliação motora através do número de entradas e saídas nos braços fechados e abertos, e medições espaço temporais de esquiwa nos braços abertos (PELLOW, 1985; LISTER, 1987).

Algumas linhagens de camundongos expressam naturalmente maior grau de ansiedade e medo que outras (BOLEIJ et al., 2012) corroborando a extrema importância de conhecer e utilizar a linhagem de camundongos mais adequada como modelo, uma vez que os resultados experimentais podem ser influenciados negativamente por comportamentos discrepantes entre os camundongos de diferentes linhagens.

Comportamento Parental

O cuidado parental pode ser definido como o conjunto de ações dos progenitores em relação aos descendentes, desde o nascimento até que eles desenvolvam características e habilidades que assegurem a sua sobrevivência (ALCOCK, 1993; EBISUI et al., 2009). Diferentemente de outros grupos, entre os mamíferos, a mãe é o principal cuidador, embora em algumas espécies o macho participe ativamente dos cuidados com a prole (LOSTEIN e VRIES, 2000; VIEIRA, 2003).

Dentre os modelos animais usados em estudos de cuidado materno, os roedores são os mais utilizados. Os ratos foram os primeiros roedores a serem usados em estudos sobre o comportamento materno. Muitas pesquisas têm sido conduzidas na tentativa de relacionar os efeitos do comportamento materno sobre a prole. Em roedores, o comportamento materno se inicia alguns dias antes do parto com a construção de ninhos mais elaborados (BRIDGES, 1997; BROWN, 1998).

O comportamento materno 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, 1997; BROWN, 1998; NUMAN et al., 1999). Quaisquer fatores que alterem a dinâmica desses processos podem provocar alterações de comportamento.

No camundongo, o parto ocorre nas primeiras horas de luz, após um período de gestação de 19 a 21 dias, exceto para as fêmeas que estejam amamentando (nesta espécie isto é possível por apresentarem cio pós-parto) quando o período gestacional pode se prolongar por até 5 dias (KO, 2009). No momento do parto ocorre o primeiro vínculo mãe – filhote. Após o nascimento dos filhotes a mãe os limpa ingerindo a placenta, lambe-os e coloca-os no ninho, deita-se sobre as crias com o cuidado de deixar suas mamas acessíveis aos filhotes (postura de amamentação).

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 (KÖNIG e MARKL, 1987; VIEIRA, 2003). Por ser uma espécie altricial, os filhotes são totalmente dependentes de intensos cuidados maternos nos primeiros dias de vida. Nesta fase, a qualidade do ninho e dos materiais empregados na sua confecção pode influir diretamente na sobrevivência da ninhada.

Na natureza, os camundongos utilizam pelos e plantas como material para confecção de ninhos (ALCOCK, 1993). Nos biotérios de produção, as fêmeas utilizam o material disponível na gaiola para a confecção do ninho. Este é um comportamento que contribui para manter constante a temperatura corporal das crias (BARNETT, 1975), além de intensificar o contato mãe-filhote, facilitando o emprego dos cuidados maternos através do agrupamento dos filhotes no ninho (FLEMING et al., 1999). O ato de lamber 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, fase em que eles ainda não possuem este reflexo (BROUETTE-LAHLOU et al., 1998; EBISUI et al., 2009).

Cabe destacar que, embora o filhote de camundongo seja extremamente frágil e dependente nos primeiros dias de vida, ele tem papel ativo na sua própria sobrevivência, uma vez que tem potencial para extrair o maior grau de investimento materno possível. Seu comportamento é um dos fatores responsáveis por modular a intensidade do comportamento materno (FLANNELLY e KEMBLE, 1987; ROSENBLATT et al., 1994).

Segundo Rosenblatt et al. (1994) os filhotes, de uma forma geral, emitem pistas olfativas que são fundamentais para a manutenção da responsividade materna. Logo após o parto, se estabelece uma comunicação vocal entre mãe e filhotes, crucial para a manutenção dos cuidados maternos (COHEN-SALMON et al., 1985; EHRET e BERNECKER, 1986).

Embora surdos nos primeiros dias de vida, os filhotes emitem uma variedade de vocalizações ultrassônicas quando isolados da presença materna atraindo sua atenção (BRANCHI et al., 1998). Apesar da potencial desvantagem da emissão de vocalização, como o aumento do risco de predação e o custo energético em produzi-las, alguns autores consideram essa comunicação essencial para a sobrevivência da ninhada (ELWOOD et al., 1990; EHRET e BERNECKER, 1986). Os filhotes também exercem influência sobre a produção de leite de suas mães. Segundo Ko (2009), o estímulo de sucção da prole é indispensável para a manutenção da produção de prolactina e ocitocina durante o período de aleitamento.

Segundo Bonsignore et al. (2006) os comportamentos característicos de cuidado materno diretos são a postura de amamentação, lambidas e manutenção da cria agrupada e aquecida. Os comportamentos indiretos correspondem aos cuidados com o ninho e a

defesa da cria diante de um agente agressor. Alguns autores sugerem que os comportamentos que caracterizam o investimento materno na sobrevivência dos filhotes têm, além da influência de fatores hormonais somados aos estímulos sensoriais das ninhadas, fatores neurológicos e genéticos com mecanismos ainda pouco esclarecidos (FRANCIS e MEANEY, 1999; CHAMPAGNE et al., 2003; MCFARLAND, 2008; LONSTEIN e GAMMIE, 2002; BONSIGNORE et al., 2006).

Alguns estudos apontam as regiões da amígdala, núcleo acumbens e área préóptica medial como as mais relacionadas à expressão do comportamento maternal (BRIDGES et al., 1990; CALAMANDREI, 2006).

Em camundongos, a divisão dos cuidados parentais não é clara. O comportamento paterno é pouco estudado em relação ao comportamento maternal, em parte devido à amamentação, período em que as mães são as únicas responsáveis pela alimentação da prole, o que faz com que elas fiquem muito mais tempo em contato com a ninhada que os pais. Segundo Brown (1998) os machos de roedores normalmente não cuidam dos filhotes e são inclusive os autores de infanticídios.

No entanto, alguns estudos indicam que os cuidados empregados pelo macho contribuem para a sobrevivência e crescimento da ninhada. Dentre os comportamentos indiretos de cuidado paterno podemos citar a defesa de território, que preserva a fonte de alimento das fêmeas e evita a aproximação de outros machos, que podem representar perigo à sobrevivência da prole (VIEIRA, 2003; WEBER E OLSSON 2008). Os cuidados diretos incluem lambar e agachar sobre os filhotes favorecendo a regulação da sua temperatura corporal (CANTONI e BROWN, 1997).

Entretanto, alguns estudos sugerem diferenças na modulação dos comportamentos materno e paterno. Enquanto o cuidado materno é desencadeado por mudanças hormonais durante o período de prenhez e, principalmente após o parto, aliado aos estímulos da prole, o comportamento paternal é mais influenciado pela interação com a mãe do que com a prole. Segundo Vieira (2003) a presença da mãe é mais efetiva para a manutenção da responsividade paterna devido, possivelmente, a estímulos e experiências advindos do acasalamento e coabitação com a fêmea prenha. Segundo o autor os fatores neuroendócrinos seriam mais importantes para as fêmeas do que para os machos em relação aos cuidados com a prole. No entanto, alguns estudos demonstram que hormônios como a ocitocina (GUBERNICK et al., 1995) e prolactina

(SCHRADIN e ANZENBERGER, 1999), com papel importante no desencadeamento e na manutenção do comportamento materno, também estão presentes na modulação do comportamento paterno (apud VIEIRA, 2003).

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 (FUMDHAM, 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.

Atualmente, o debate sobre o bem-estar animal tem apresentado 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 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 sobre o 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. Essa 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 autoclavagem, 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 protegido, estimulando o cuidado parental e assim aumentando as chances de sobrevivência dos filhotes nos primeiros dias de vida.

Contudo, alterações ambientais, mesmo que cuidadosas, implicam em mudanças comportamentais dos animais. Segundo Nithianantharajah e Hannan (2006) o enriquecimento ambiental tem promovido efeitos celulares, moleculares e comportamentais em ratos e camundongos. Alguns estudos sugerem que, além da alteração do peso do cérebro como já descrito, os efeitos podem incorrer principalmente sobre a plasticidade neuronal em vários níveis do cérebro (FERNANDEZ et al., 2003; DHANUSHKODI, 2008; MADROÑAL et al., 2010).

Estudos demonstram que as diferentes linhagens de camundongos apresentam reações comportamentais distintas frente à modificação ambiental, particularmente nas que envolvem agressividade (MARASHI et al., 2003) medo ou ansiedade (VAN DE WEERD et al., 1994).

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.

A adoção do enriquecimento ambiental adequado pode ser considerada como um refinamento na prática de criação de animais de laboratório e é uma importante etapa da implantação dos princípios dos 3 R s em Biotérios. Além disso, o enriquecimento do ambiente, com o fornecimento de material para nidificação, pode diminuir o número de matrizes em produção caso efetivamente aumente a produtividade e diminua a mortalidade, conforme demonstrado por MOREIRA et al. (2015).

Assim, as mudanças ambientais para fêmeas em produção devem ser conduzidas pelos bioteristas com enfoque no bem-estar animal, mas buscando, paralelamente, o aumento da produção e levando em consideração as diferenças fenotípicas, genéticas e

comportamentais exibidas pela variada gama de linhagens produzidas e mantidas atualmente nos biotérios de produção de camundongos. Desta forma, optamos por estudar as linhagens *BALB/c* e *Swiss* devido à alta demanda destes animais na produção de imunobiológicos e pela falta de pesquisas comparativas entre eles que atrelem o desempenho reprodutivo, bem - estar e comportamento.

O capítulo 2, denominado “Eficiência reprodutiva de camundongos isogênicos e heterogênicos produzidos em ambiente modificado pelo fornecimento de material para nidificação”, apresenta-se de acordo com as normas do *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. O objetivo deste estudo foi avaliar a preferência e o impacto do fornecimento de dois tipos de materiais de nidificação sobre o desempenho produtivo de camundongos isogênicos e heterogênicos em sistema de acasalamento intensivo monogâmico.

O capítulo 3, denominado “Comportamento parental de camundongos isogênicos e heterogênicos submetidos à modificação ambiental, com o fornecimento de material para nidificação”, apresenta-se de acordo com as normas da revista *Applied Animal Behaviour Science*. O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência da modificação ambiental no comportamento materno e paterno de camundongos isogênicos e heterogênicos em sistema de acasalamento intensivo monogâmico, através da avaliação comportamental e teste de ansiedade.

Referências

ABRAMOV, U. et al. Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. **Neuroscience Letters**, v. 443, n. 3, p. 223-227, 2008.

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.

ARNDT, S. S. et al. Individual housing of mice--impact on behaviour and stress responses. **Physiology & Behavior**, v. 97, n. 3-4, p. 385-93, 2009.

AUSTIN, C. P. et al. The knockout mouse project. **Nature Genetics**, v. 36, n. 9, p. 921-4, 2004.

BARNETT, S. A.; MUNRO; K. M. H.; SMART, J. L.; STODDART, R.C. House mice bred for many generations in 2 environments. **Journal of Zoology**., v. 177, p. 153–169,1975.

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

BLANCHARD, R. J.; YUDKO, E. B.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, D. C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research**, v.58, p.155-165, 1993.

BOLEIJ, H.; SALOMONS, A.R.; VAN SPRUNDEL, M.; ARNDT S. S.; OHL, F. Not all mice are equal: welfare implications of behavioural habituation profiles in four 129 mouse substrains. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, e.42544, 2012.

BOND, T. L. et al. Nest building in nulligravid, primigravid and primiparous C57BL/6J and DBA/2J mice (*Mus musculus*). **Physiology Behavior**, v. 75, n. 4, p. 551-5, 2002.

BONSIGNORE, L.T. et al. Acute perinatal asphyxia at birth has long-term effects on behavioural arousal and maternal behaviour in lactating rats. **Behavioural Brain Research**, v.172, p.54-62, 2006.

BRAGA, L. M. G. M. Os 3 Rs. 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. 29-36.

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.

BRANCHI, I., SANTUCCI, D., VITALE, A., and ALLEVA, E. Ultrasonic vocalizations by infant laboratory mice: a preliminary spectrographic characterization under different conditions. **Developmental Psychobiology**, v. 33, p.249-256, 1998.

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.

BRIDGES, R. S. et al. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroidtreated, nulliparous female rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.v.87, p.8003-8007,1990.

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.

BROOKS, S. P. et al. Behavioral profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. II: cognitive tests. *Genes, Brain and Behavior*, v.4, p. 307-317, 2005.

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

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.

CALAMANDREI, G. et al.. Efficient testing strategies for evaluation of xenobiotics with neuroendocrine activity. **Reproductive Toxicology**. V.22, p.164-174, 2006.

CANTONI, D. & BROWN, E. R. Paternal investment and reproductive success in the California mouse, *Peromyscus californicus*. **Animal Behaviour**, v. 54, n. 2, P. 241-484, 1997.

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.

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

CHIA, R. et al. The origins and uses of mouse outbred stocks. **Nature Genetics**, v. 37, p. 1181-1186, 2004.

COHEN-SALMON, C.; CARLIER, M.; ROUBERTOUX, P.; JOUHANEAU, J.; SEMAL, C. & PAILLETTE, M. Differences in patterns of pup care in mice. V. Ultrasonic emissions and pup care behavior. **Physiology & Behavior**, v. 35, p. 167-174, 1985.

CRAWLEY, J. N. et al. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 132, n. 2, p. 107-24, 1997.

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.

DHANUSHKODI, A.; SHETTY, A. K. Is exposure to enriched environment beneficial for functional post-lesional recovery in temporal lobe epilepsy? **Neuroscience Biobehaviour Reviews**, v. 32, n 4, p.657-674, 2008.

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.

DUDEK, B. C. et al. Genetic influences on digging behaviors in mice (*Mus musculus*) in laboratory and seminatural settings. **Journal of Comparative Psychology**, v. 97, n. 3, p. 249-59, 1983.

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

EBISUI, L.; FONTES, R. S.; LAPCHIK, V. B. V. Rato. 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. 229-250.

EHRET, G. & BEMECKER, C. Low-frequency sound communication by mouse pups (*Mus musculus*): Wriggling calls release maternal behavior. **Animal Behaviour**, v. 34 p. 821-830, 1986.

ELWOOD, R. W.; NESBITT, A. A.; KENNEDY, H. F. Maternal aggression in response to the risk of infanticide by male mice, *Mus domesticus*. **Animal Behaviour**, v. 40, p. 1080-1086, 1990.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animais de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso de corrente. **Acta Cirúrgia Brasileira**, v. 19, 2004.

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.

FERNANDEZ, V.; FERNANDEZ, B.; ADARO, L. Early polysensorial enrichment: Specific experience-induced structural changes in the parietooccipital cortex of the rat. **Growth, Development, and Aging**, v. 67, p. 3-10, 2003.

FERRARI, P. F. et al. Comparing different forms of male and female aggression in wild and laboratory mice: an ethopharmacological study. **Physiology Behaviour**, v. 60, n. 2, p. 549-53, 1996.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. **Modelos Experimentais em pesquisa**. São Paulo: Acta Cirúrgica Brasileira. 20 2005.

FLAMIELLY, K. I.; KEMBLE, E.D. The effect of pup presence and intruder behavior on maternal aggression in rats. *Bull. Psychonomic Bulletin & Review*, v. 25, p. 133-135, 1987.

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.

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.

FUNDAÇÃO MUSEU DO HOMEM AMERICANO. FUMDHAM. **Pinturas rupestres**: Parque Nacional Serra da Capivara. Piauí. Disponível em: <http://www.fumdham.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. **A clonagem posicional- uma abordagem para o estudo do genoma funcional**. Ribeirão Preto: SBG, 2008.

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.

GRAEFF, F.G. Medicamentos ansiolíticos. In: GRAEFF, F. G., GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, p. 123-160, 2005.

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.

HOCHMAN, B.; FERREIRA, L. M.; VILAS BÔAS, F.C.; MARIANO, M. **Experimental model in hamsters (*Mesocricetus auratus*) to study heterologous graft of scars and cutaneous diseases in plastic surgery**. São Paulo: Acta Cirúrgica Brasileira. 2004.

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.

KAPLAN A. (1973). *The Conduct of Inquiry. Methodology for Behavioral Sciences*. Aylesbury, Buckinghamshire: International Textbook Company, *In*: Belzung C.; Griebel G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review. **Behavioral Brain Research**, 125: 141-149.

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.

KNIGHT, J.; ABBOTT, A. Full house. **Nature**, v. 417, n. 6891, p. 785-6, 2002.

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.

KOIKE, H. et al. Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. **Behavioural Brain Research**, v. 202, n. 1, p. 114-21, 2009.

KÖNIG, B. and MARKL, H. Maternal care in house mice. **Behavior Ecology Sociobiology**, v.20, p. 1-9, 1987.

LONSTEIN, J. S.; VRIES, G. J. Sex differences in the parental behavior of rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, p.669-686, 2000.

LONSTEIN, J. S.; GAMMIE, S. C. Sensory, hormonal and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 869-888, 2002.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**. v. 92, p. 180-185, 1987.

LYNCH CJ. The so-called Swiss mouse. **Laboratory Animal Care**, v. 19, p. 214-220, 1969.

MADROÑAL, N.; LÓPEZ-ARACIL, C.; RANGEL, A.; DEL RIO, J. A.; DELGADO-GARCÍA, J. M. Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. **PLoS ONE**, v.5, n. 6, e.11130, 2010.

MAESTRIPIERI, D.; ALLEVA, E. Maternal Aggression and Litter Size in the Female House Mouse. **Ethology**, v. 84, n. 1, 1990.

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.

MASSIRONI, S. M. G. Desenvolvimento de linhagens de camundongos. In: MATTARAIA, V. G. M.; OLIVEIRA, G.M. (Ed.). **Comportamento de Camundongos em Biotério**. São Paulo: SBCAL, 2012. p. 55-74.

MARASHI, V.; BARNEKOW, A.; OSSENDORF, E.; SACHSER, N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 281-292, 2003.

MARASHI, V.; BARNEKOW, A.; SACHSER, N. Effects of environmental enrichment on males of a docile inbred strain of mice. **Physiology Behavior**, v. 82, n. 5, p. 765-76, 2004.

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.

Medical advances and animal research. 2014. Disponível em: < <http://www.understandinganimalresearch.org.uk/files/7214/1041/0599/medicaladvances-and.pdf> >. Acesso em: 18/12.

MELLEN, J.; MACPHEE, M. S. Philosophy of environmental enrichment: Past, present, and future. **Zoology 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.

MCKINNEY, W.T. (1984). Animal models of depression: an overview. *Psychiatric Development*, 2: 77-96, In: Belzung C.; Griebel G. (2001). Measuring normal and

pathological anxiety- like behavior in mice: a review. **Behavioral Brain Research**, 125: 141-149.

MOORE, K. J. Utilization of mouse models in the discovery of human disease genes. **Drug Discovery Today**, v. 4, n. 3, p. 123-128, 1999.

MOREIRA, VB, MATTARAIA, VGM, MOURA, ASAMT. Lifetime Reproductive Efficiency of BALB/c Mouse Pairs after an Environmental Modification at 3 Mating Ages. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, p. 29-34, January 2015.

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.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN A. J. Enriched environments, experiencedependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v.7, p. 697-709, 2006.

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.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal Neuroscience Methods**, v. 14. p. 149-167, 1985.

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

POILEY, S. M. A systematic method of breeding rotation for non-inbred laboratory animal colonies. **Proc. Animal. Care Panel**, v. 10, p. 159, 1960.

RAPP, K. G. HAN-rotation, a new system for rigorous outbreeding. **Zeitschrift fur Versuchstierkunde**, v. 14, n. 3, p. 133-42, 1972.

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

RICE, M. C.; O'BRIEN, S. J. Genetic variance of laboratory outbred Swiss mice. **Nature**, v. 283, n. 5743, p. 157-61, 1980.

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.

ROSENBLATT, J. S.; FACTOR, E. M. & MAYER, A. D. Relationship between maternal aggression and maternal care in the rat. **Aggressive Behavior**, v. 20, p. 243-255, 1994.

RUSSEL, W.; BURCH, R. **The principles of humane experimental technique**, 1959.

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.

SUCKOW, M.A.; DANNEMAN, P.; BRAYTON, C. **The Laboratory Mouse**. Boca Raton: CRC Press. 2001.

TARANTINO, L. M. et al. Behavior and mutagenesis screens: the importance of baseline analysis of inbred strains. **Mammalian Genome**, v. 11, n. 7, p. 555-64, 2000.

VAN DE WEERD, H.A.; BAUMANS, V.; KOOLHAAS, J. M.; VAN ZUTPHEN, L. F. Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. **Journal of experimental Animal Science**, v. 36, p.117-127, 1994.

VAN LOO, P. L. P.; VAN DE WEERD, H. A.; VAN ZUTPHEN, L. F. M.; BAUMANS, V. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. **Laboratory Animals**, v. 38, n. 2, p. 178-188, 2004.

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

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.

WATERSON, R. H.; LINDBLAD-TOH, K. E. A. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Mouse Genome Sequencing Consortium. **Nature**, v. 420, p. 520-62, 2002.

WEBER, E. M.; OLSSON, I. A. S., 1–22. . Maternal behaviour in mus musculus sp: an ethological review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, p. 1-22, 2008.

WOLFF, J. O.; PETERSON, J. A. An offspring-defense hypothesis for territoriality in female mammals. **Ethology Ecology & Evolution**, v. 10, n. 3, p. 227-239, 1998.

ZANGROSSI, H. J.; GRAEFF, F. G. Modelos Animais. In: HETEM, L. A. B. e GRAEFF, F. G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 55-74.

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

RUSSEL, W. S.; BURCH, R. L. The Principles of humane experimental technique. The Johns Hopkins Center for Alternative to Animal Testing. Disponível em :http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.hmt. Acesso em 16 dez. 2014.

CAPÍTULO 2

Eficiência reprodutiva de camundongos isogênicos e heterogênicos produzidos em ambiente modificado pelo fornecimento de material para nidificação

Eficiência reprodutiva de camundongos isogênicos e heterogênicos produzidos em ambiente modificado pelo fornecimento de material para nidificação

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a preferência e efeito do fornecimento de materiais de nidificação sobre o desempenho reprodutivo de camundongos isogênicos da linhagem *BALB/c* e da linhagem heterogênica *Swiss* em sistema de acasalamento intensivo monogâmico. Primeiro foi realizado um estudo para avaliar a preferência dos camundongos pelo material oferecido para nidificação. Utilizou-se um sistema composto de quatro gaiolas, com livre acesso a água e ração, interligados por tubos de PVC que permitiam que os animais se locomovessem entre todas as gaiolas. Quatro tipos de materiais foram oferecidos para a construção do ninho: algodão, gaze, rolinho de papelão, e touca de polipropileno descartável. Cada um dos quatro materiais foi oferecido simultaneamente em uma das quatro gaiolas que compunham o sistema. Foram usados 10 sistemas iguais e cada um abrigou um casal da linhagem *BALB/c*, desde os 28 dias de idade até o terceiro ciclo reprodutivo. Os mais encontrados na confecção do ninho, em ordem decrescente, foram a touca, rolinho, algodão e gaze ($P < 0,0083$). Com base nestes resultados foram selecionados dois tipos de materiais para fornecimento aos animais no experimento 2. Embora o rolinho tenha sido o segundo material mais utilizado optou-se pelo algodão devido a inviabilidade de fornecimento do item durante todo o período de duração do experimento 2. O segundo experimento avaliou a eficiência reprodutiva em cinco ciclos reprodutivos do nascimento até o desmame. Usou-se 60 casais de irmãos completos da linhagem *BALB/c* (isogênica) e 60 casais formados por acasalamentos aleatórios da linhagem *Swiss* (heterogênica) de padrão sanitário controlado, criados e mantidos em ambiente padronizado. Eles foram distribuídos, num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2 (duas linhagens em alojamento com ou sem material para nidificação). Como forma de enriquecimento da gaiola foram utilizados os materiais mais encontrados na composição dos ninhos durante o teste de preferência (touca descartável de polipropileno cortada em 8 pedaços de aproximadamente 1 cm cada e um pedaço de algodão de aproximadamente 3 g), previamente embalados e autoclavados. Foram avaliadas: idade ao primeiro parto, intervalo entre partos, mortalidade pré-desmama, número de nascidos e desmamados totais. Também as características relacionadas ao peso: peso da ninhada ao nascer e a

desmama (21 dias), peso médio da ninhada ao nascer e a desmama (21 dias) e ganho de peso diário do nascimento a desmama. A linhagem influenciou todas as características estudadas ($P < 0,005$) com exceção do peso médio a desmama ($P=0,1871$). Houve efeito da interação entre a linhagem e a modificação ambiental sobre o peso médio ao nascer ($P < 0,0001$). O fornecimento de dois tipos de materiais para nidificação aumentou o peso médio ao nascer na linhagem *BALB/c* e diminuiu a mesma característica na linhagem *Swiss* ($P < 0,0001$ e $P = 0,0036$). A interação linhagem x ordem de parto teve efeito sobre o número de nascidos e desmamados ($P < 0,0001$) e taxa de mortalidade ($P = 0,0232$). Ocorreram efeitos de interação tripla (linhagem, ordem de parição e enriquecimento) sobre os pesos ao nascer ($P = 0,0234$) e ao desmame ($P = 0,0232$) e o ganho de peso do nascimento a desmama ($P = 0,0270$). O peso médio a desmama foi influenciado apenas pela ordem de parição. Os resultados sugerem que esta modificação ambiental com pedaços de touca e algodão não afeta o desempenho reprodutivo dos animais e que as diferenças genéticas devem ser levadas em consideração na definição das condições de habitação destes animais.

Palavras chave: Bem-estar, Habitação, Produção Animal, Teste de Preferência.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the preference and effect of nesting materials provision on performance of inbred mice of the BALB/c strain and of heterogenic Swiss in intensive monogamous mating system. Firstly, a study was conducted to evaluate the preference of mice for the material offered for nesting. A system composed of four cages was used, with free access to water and food, connected by PVC tubing, which allowed animal displacement among all cages. Four types of materials were available for construction of the nest: cotton, gauze, cardboard rolls, and disposable polypropylene cap. Each of the four materials was offered simultaneously in one of four cages that formed the system. Ten identical system were used and each one housed a *BALB/c* couple, from 28 days of age up to the third reproductive cycle. The most commonly found materials in nest making were cap, roll, cotton and gauze ($P < 0.0083$). Based on these results, two types of materials were selected to be offered to the animals in experiment 2. Although the roll was the second most used material, we chose cotton due to unfeasibility supplying of the item throughout the duration of the second experiment. The second experiment evaluated the reproductive efficiency in five reproductive cycles from birth to weaning. Sixty *BALB / c* full siblings pairs (inbred) and 60 pairs formed by random mating of Swiss strain (outbred), bred and maintained in a standardized environment were used. They were distributed in a completely randomized design in a 2x2 factorial arrangement (two strains in housing with or without nesting material). As a way of cage enrichment, polypropylene disposable cap cut into 8 pieces of approximately 1 cm each and one piece of cotton about 3 g were used after being previously packaged and autoclaved. The following characteristics were evaluated: age at first parturition, litter intervals, pre-weaning mortality and number born and weaned. Traits related to weight: litter weight at birth and weaning (21 days), mean weight of litter from birth to weaning (21 days) and daily weight gain from birth to weaning. The strain influenced all variables ($P < 0.005$) except for the average weaning weight ($P = 0.1871$). There was a significant interaction between the strain and environmental change on the average birth weight ($P < 0.0001$). The provision of two types of material for nesting increased the average birth weight in *BALB / c* strain and decreased the same trait in the Swiss strain ($P < 0.0001$ and $P = 0.0036$). The interaction strain x birth order had an effect on the number of born and weaned ($P < 0.0001$) and on

mortality rate ($P = 0.0232$). There was triple interaction effects (strain, parity order and enrichment) on weight at birth ($P = 0.0234$) and weaning ($P = 0.0232$) and weight gain from birth to weaning ($P = 0.0270$). The average weaning weight was influenced only by parity order. The results suggest that environmental modification does not affect the reproductive performance of animals and that genetic differences must be taken into account in determining the housing conditions of these animals.

Key words: Animal Production, Housing, Preferably Test, Welfare.

1. Introdução

O desenvolvimento de vacinas para doenças infectocontagiosas requer modelos geneticamente adequados. Atendendo às exigências da Farmacopéia Americana e Brasileira e da Organização Mundial da Saúde (OMS), os camundongos são utilizados em grande quantidade nos testes pré-clínicos realizados pela indústria farmacêutica e na produção de imunobiológicos. Atualmente, a linhagem isogênica *BALB/c* e a linhagem heterogênica *Swiss* são muito utilizadas tanto na pesquisa biomédica quanto na produção de imunobiológicos.

O enriquecimento do ambiente tem sido utilizado pelos bioteristas como uma ferramenta para minimizar os danos físicos e psicológicos causados aos animais cativos, aumentando o seu grau de bem-estar através do desenvolvimento de sistemas de manejo alternativos, que promovam os comportamentos adequados à espécie (GONYOU, 1993; BAUMANS, 2000).

Entre os vários tipos de enriquecimento utilizados para camundongos, o fornecimento de material para nidificação estimula um dos mais básicos comportamentos desta espécie (ESKOLA e KALISTE - KORHONEN, 1998; LOO, 2004). Segundo Rivera (2009), a construção do ninho permite a proteção e termorregulação dos filhotes, além de funcionar como abrigo para proteção contra predadores, companheiros e outros estímulos como luz forte, por exemplo. Estudos sobre o cuidado materno têm mostrado a importância do ambiente adequado para o desenvolvimento saudável, pois diversos fatores ambientais, psicológicos, biológicos e neurais interagem para promover e manter o cuidado maternal (FRANCIS e MEANEY, 1999; CHAMPAGNE et al. 2003). No entanto, ainda permanece em discussão o impacto da modificação ambiental, com o fornecimento de material para nidificação, sobre a produtividade e o comportamento e de como este impacto pode influenciar as pesquisas realizadas com estes animais. O tipo de material mais adequado para a confecção do ninho, que promova o bem-estar dos animais e, simultaneamente, melhore os índices de produção, bem como a avaliação criteriosa sobre o comportamento de diferentes linhagens de camundongos e sua interação com o material fornecido necessitam ser evidenciados.

O objetivo deste estudo foi avaliar a preferência e efeito do fornecimento de materiais de nidificação sobre o desempenho reprodutivo de camundongos isogênicos

da linhagem *BALB/c* e da linhagem heterogênica *Swiss* em sistema de acasalamento intensivo monogâmico.

Material e Métodos

2.1. Condições gerais de ambiente e manejo

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

Os modelos biológicos utilizados foram o camundongo isogênico *BALB/c* e o de linhagem heterogênica *Swiss*, ambos oriundos do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais tinham padrão sanitário controlado e foram mantidos em gaiolas de policarbonato com dimensões de 30x20x13cm (Beira-mar[®], São Paulo), que permitiam livre acesso à água potável e à ração balanceada. 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 (Quimtia[®], Curitiba), 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 às recomendações do *National Research Council* (1995). Todos os procedimentos obedeceram às 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 103/2012.

2.2. Experimento 1: Teste de Preferência

Protocolo experimental

Foi realizado um estudo para avaliar a preferência dos camundongos pelo material oferecido para nidificação. Para isto, desenvolveu-se um aparato composto de quatro gaiolas, com livre acesso a água e ração, interligados por tubos de PVC que permitiam que os animais se locomovessem entre todas as gaiolas.



Figura 1. Foto do aparato utilizado no teste de preferência.

Quatro tipos de materiais foram oferecidos para a construção do ninho: algodão (Cremer®, São Paulo), gaze (Clean®, São Paulo), rolinho de papelão (Cia Paduana de papeis®, Rio de Janeiro) e touca (Embramac®, São Paulo) de polipropileno descartável. Todos os materiais foram previamente embalados e autoclavados, certificando-se sua esterilidade com o uso de bioindicadores. Cada um dos quatro materiais foi oferecido simultaneamente em uma das quatro gaiolas que compunham o sistema. Foram usados 10 aparatos iguais e cada sistema abrigou um casal da linhagem *BALB/c*, desde os 28 dias de idade até o terceiro ciclo reprodutivo. Os materiais foram oferecidos a cada troca de gaiola, uma vez por semana, no período da tarde. A partir do acasalamento inicial, após 24hs os ninhos eram verificados por dois observadores. Os materiais mais utilizados para nidificação indicaram a preferência pelo tipo de enriquecimento. Para a análise dos resultados do teste de preferência foi usado o teste de Qui-quadrado e a correção de Bonferroni para múltiplos testes. Com base nos resultados foram selecionados dois tipos de materiais para fornecimento aos animais no experimento 2.

2.2. Experimento 2: Desempenho Reprodutivo

Protocolo experimental

Os materiais de preferência dos animais no primeiro experimento (toucas descartáveis de polipropileno cortadas em pedaços de aproximadamente 1 cm e algodão em pedaços de aproximadamente 3 g) foram esterilizados e usados como materiais de nidificação neste experimento. Os animais receberam como material para nidificação oito pedaços de touca e um pedaço de algodão, introduzidos na gaiola a cada troca de gaiola, ou seja, duas vezes por semana.

Foram utilizados 60 casais de irmãos completos da linhagem *BALB/c* (isogênica) e 60 casais formados por acasalamentos aleatórios da linhagem *Swiss* (heterogênica). Estes animais foram distribuídos, num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2 (duas linhagens e alojamento com ou sem material para nidificação):

Esta formação foi mantida, desde o acasalamento aos 28 dias até o encerramento do experimento. O experimento foi encerrado quando 80% das fêmeas completaram o quinto ciclo reprodutivo (desmame da ninhada), que correspondeu a 254 dias para a linhagem *BALB/c* e 232 dias para a linhagem *Swiss*.

Os animais utilizados para formação dos casais eram todos da mesma idade, mas provenientes de diferentes ninhadas. Os animais utilizados para formação dos grupos com nidificação foram provenientes de parentais que também receberam touca e algodão como forma de enriquecimento. Ou seja, pertenciam a ninhadas que permaneceram desde o nascimento até o desmame em ambiente enriquecido, diferentemente dos animais formadores do grupo sem nidificação, que permaneceram durante o mesmo período em gaiolas que continham apenas cama de maravalha.

Para manter a isogenicidade da linhagem *BALB/c*, os acasalamentos foram realizados entre irmãos completos, da mesma ninhada. 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. Neste mesmo dia foram sorteados, aleatoriamente, 60 machos e 60 fêmeas (irmãos), que foram acasalados imediatamente. Os sorteios ocorreram tanto em relação à formação dos grupos (com ou sem material de nidificação), quanto em relação à posição das gaiolas nas estantes. Repetiu-se o mesmo processo para a linhagem *Swiss*

observando-se a heterogeneia característica desses animais. Desta forma, os acasalamentos foram aleatórios evitando-se o acasalamento de animais aparentados.

Todos os casais foram mantidos em sistema monogâmico intensivo, até completarem cinco ciclos reprodutivos consecutivos. Não houve descarte de animais ao nascer para limitar as ninhadas, todos os filhotes nascidos vivos permaneceram nas gaiolas. Durante esse período foram avaliadas as seguintes características reprodutivas e de sobrevivência: idade ao primeiro parto, intervalo de partos, taxa de mortalidade, taxa de mortalidade transformada (arco seno da raiz quadrada). Foram ainda consideradas as seguintes características relacionadas ao peso: peso da ninhada ao nascer, peso da ninhada à desmama (21 dias), peso médio da ninhada ao nascer, peso médio da ninhada à desmama (21 dias) e ganho de peso diário do nascimento à desmama. Os nascimentos foram verificados e as ninhadas pesadas 2 vezes ao dia (uma vez no período da manhã e outra no período da tarde) e características relacionadas à produtividade numérica total: nascidos e desmamados totais.

2.3 Análise Estatística

As características de desempenho de ninhadas nos primeiros cinco ciclos reprodutivos foram analisadas de acordo com modelos de medidas repetidas (ordens de parição) implementado no procedimento MIXED do SAS (2003). Estes modelos incluíram os efeitos fixos de linhagem, presença de material de nidificação, ordem de parição e todas as interações. Uma estrutura de covariância autorregressiva [AR(1)] foi adotada. Somente as ninhadas que tiveram pelo menos um filhote desmamado foram consideradas nestas análises. Para as características avaliadas à desmama, a idade à desmama foi incluída no modelo de análise como covariável. Contrastes apropriados foram computados quando necessário.

Resultados

Experimento 1

Os animais interagiram com todos os materiais oferecidos para nidificação (Figura 1). Os mais utilizados para a confecção do ninho foram, em ordem decrescente de preferência, a touca, o rolinho e o algodão. O teste de qui-quadrado comparando o número de interações com os quatro materiais foi significativo ($P < 0,0083$). As comparações dos materiais dois a dois são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Número de vezes que o material oferecido para nidificação foi utilizado na construção do ninho.

Material (n° de interações)	Significância ¹
Touca (75) x algodão (35)	*
Touca (75) x rolinho (49)	ns
Touca (75) x gaze (21)	*
Algodão (35) x gaze (21)	ns
Rolinho (49) x gaze (21)	*
Rolinho (49) x algodão (35)	ns

¹ Usado teste de qui-quadrado e a correção de Bonferroni para múltiplos testes ($P < 0,0083$).

Experimento 2

O número de partos por fêmea por linhagem não diferiu entre os tratamentos. O experimento foi encerrado quando 80% das fêmeas alcançaram o quinto parto o que correspondeu a um período de 254 dias na linhagem *BALB/c* e 232 dias na linhagem *Swiss*, com uma variação de 7% entre os tratamentos para o período e linhagens estudados (Tabela 2).

Tabela 2. Número de fêmeas por parto com ou sem material de nidificação nos cinco primeiros ciclos reprodutivos para as linhagens *BALB/c* e *Swiss*.

Linhagem	Material de nidificação	Número de fêmeas						
		Início	0	1	2	3	4	5
<i>BALB/c</i>	Com	30	1	0	1	0	2	26
<i>BALB/c</i>	Sem	30	3	1	0	0	1	25
<i>Swiss</i>	Com	30	1	1	0	0	2	26
<i>Swiss</i>	Sem	30	1	1	1	1	2	24

A idade ao primeiro parto diferiu entre as linhagens ($P = 0,0101$) com $94,10 \pm 3,69$ dias para a linhagem *BALB/c* enquanto as fêmeas *Swiss* apresentaram idade ao primeiro parto aos $80,53 \pm 3,63$ dias.

Houve efeito da interação entre a linhagem e a modificação ambiental sobre o peso médio ao nascer ($P < 0,0001$). O fornecimento de dois tipos de material para nidificação aumentou o peso médio ao nascer na linhagem *BALB/c* e diminuiu a mesma característica na linhagem *Swiss* ($P < 0,0001$ e $P = 0,0036$) (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da interação de linhagem e material para nidificação ($P < 0,0001$) sobre o peso médio ao nascer.

Linhagem	Material de Nidificação	
	Sim	Não
<i>BALB/c</i>	$1,76 \pm 0,02^a$	$1,62 \pm 0,02^b$
<i>Swiss</i>	$1,51 \pm 0,02^b$	$1,60 \pm 0,02^a$

Unidade: gramas

^{ab}: médias seguidas de diferentes letras na mesma linha diferem entre si a 5%.

Todas as características estudadas foram influenciadas pela linhagem com exceção do peso médio a desmama (Tabela 4). A ordem de parição teve efeito sobre o número de nascidos e desmamados, peso ao nascer e ao desmame, peso médio ao desmame e ganho de peso do nascimento a desmama. O material de nidificação não influenciou sozinho nenhuma das características estudadas.

Tabela 4. Efeito da linhagem e do material de nidificação sobre a produtividade parental nos cinco primeiros ciclos reprodutivos de camundongos *BALB/c* e *Swiss*.

Características	Linhagem		Material nidificação		Valor de P
	<i>BALB/c</i>	<i>Swiss</i>	Sim	Não	
Número de nascidos	5,51 ± 0,20	8,64 ± 0,20	7,15 ± 0,20	6,99 ± 0,21	0,5731
Número de desmamados	5,40 ± 0,20	8,31 ± 0,20	6,95 ± 0,20	6,76 ± 0,20	0,5195
Intervalo entre partos, dias	33,31 ± 0,94	29,08 ± 0,96	30,79 ± 0,93	31,60 ± 0,96	0,5467
Taxa de mortalidade	1,61 ± 0,49	3,47 ± 0,49	2,44 ± 0,48	2,64 ± 0,50	0,7673
Taxa de mortalidade transformada	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,9542
Peso da ninhada ao nascer, g	9,21 ± 0,26	13,02 ± 0,26	11,20 ± 0,25	11,03 ± 0,26	0,6540
Peso da ninhada à desmama, g	59,18 ± 1,78	88,93 ± 1,79	74,63 ± 1,76	73,48 ± 1,81	0,6480
Peso médio ao nascer, g	1,70 ± 0,01	1,56 ± 0,01	1,63 ± 0,01	1,61 ± 0,01	0,2410
Peso médio à desmama, g	11,24 ± 0,12	11,02 ± 0,12	11,10 ± 0,11	11,18 ± 0,12	0,6150
Ganho de peso do nascimento à desmama, g/dia	2,38 ± 0,07	3,62 ± 0,07	3,02 ± 0,07	2,97 ± 0,07	0,6181

A interação linhagem x ordem do parto ($P < 0,0001$) influenciou o número de nascidos e desmamados (Figuras 2 e 3).

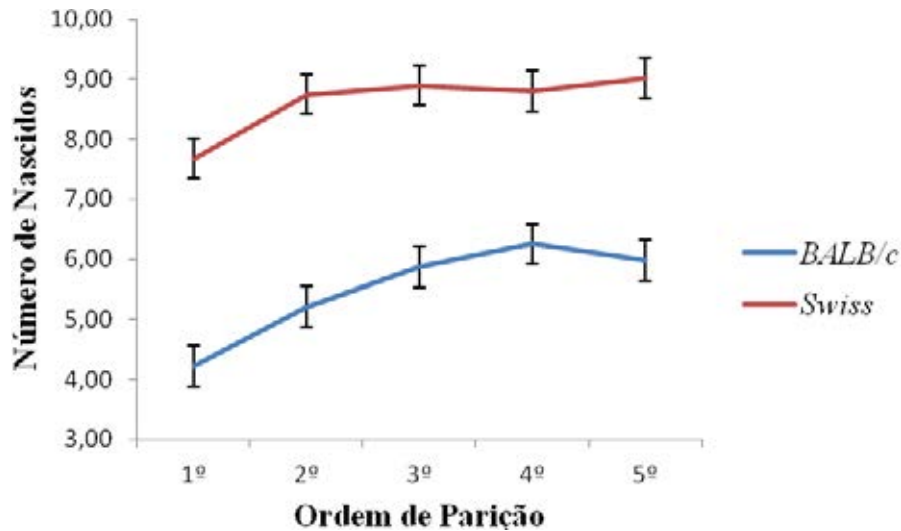


Figura 2. Número de nascidos de acordo com a ordem de parição em camundongos *BALB/c* e *Swiss*.

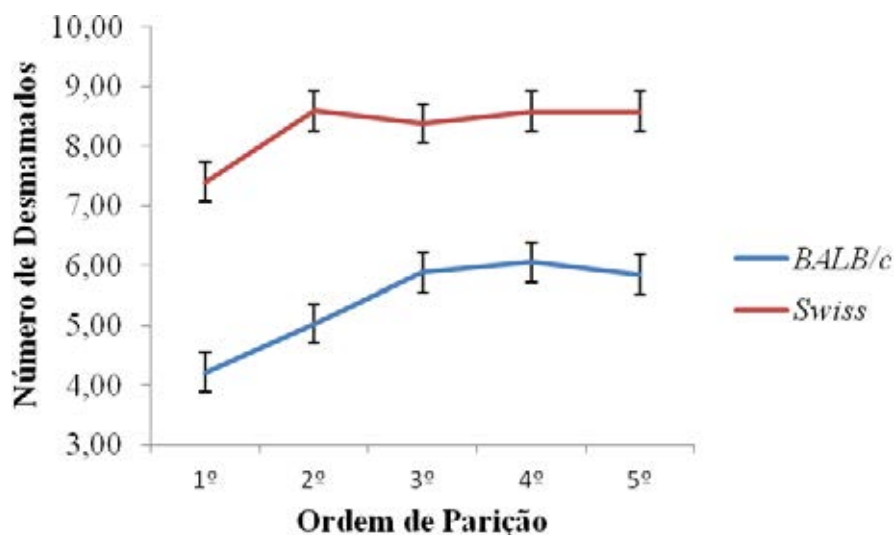


Figura 3. Número de desmamados de acordo com a ordem de parição em camundongos *BALB/c* e *Swiss*.

Foi detectado o efeito da interação linhagem x ordem de parição sobre a taxa de mortalidade ($P = 0,0232$) nas linhagens estudadas (Figura 4).

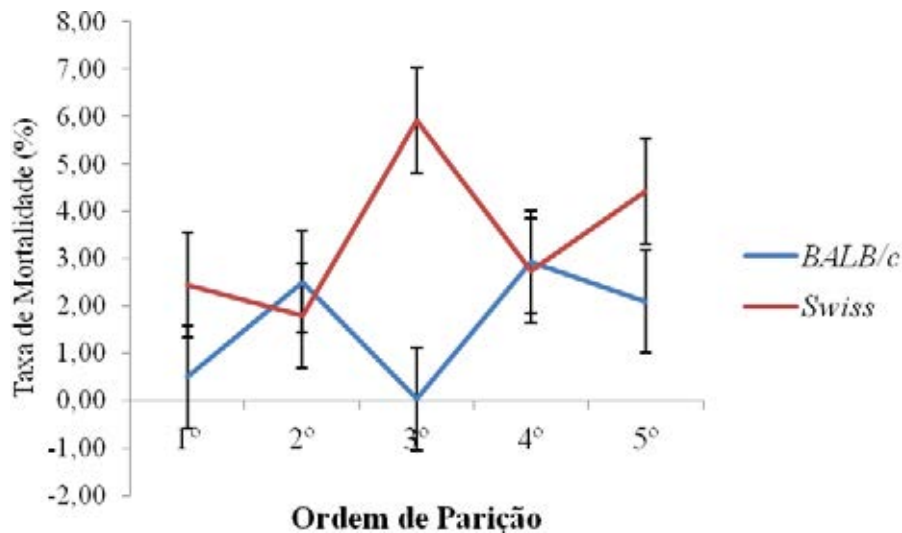


Figura 4. Taxa de mortalidade pré-desmama em camundongos *BALB/c* e *Swiss* de acordo com a ordem de parição.

Com relação às características relacionadas ao peso, ocorreram efeitos de interação tripla (linhagem, ordem de parição e enriquecimento) sobre o peso ao nascer ($P = 0,0234$) e ao desmame ($P = 0,0232$) e o ganho de peso do nascimento a desmama ($P = 0,0270$) (Figuras 5, 6 e 7 respectivamente). O peso médio a desmama foi influenciado apenas pela ordem de parição.

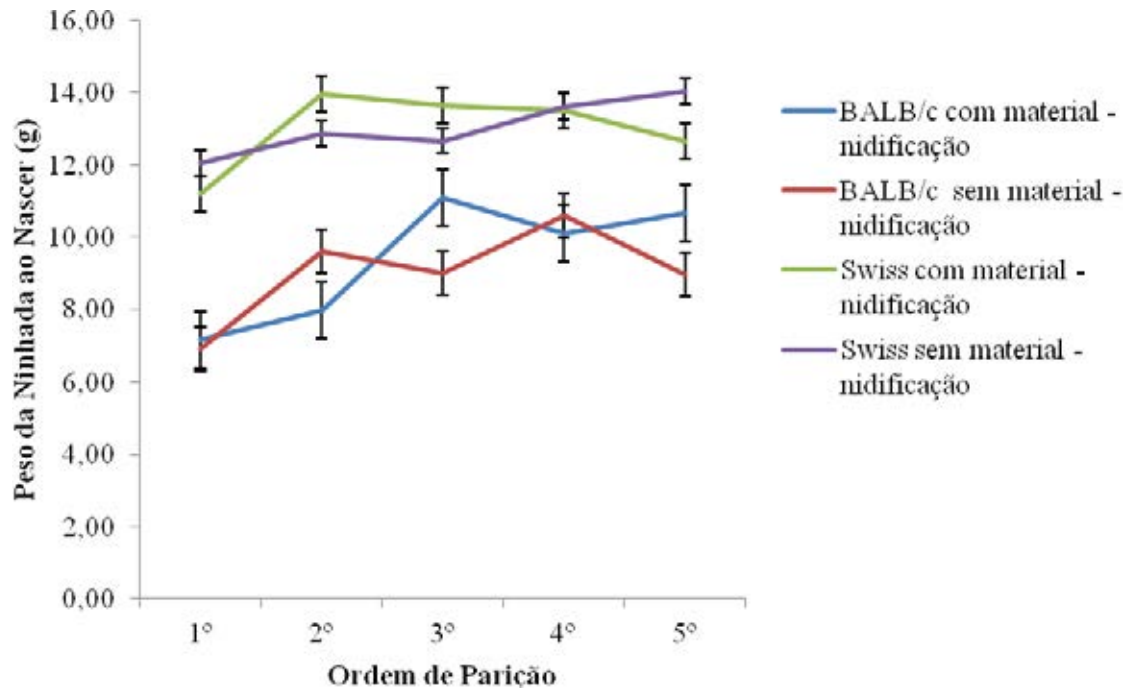


Figura 5. Peso da ninhada ao nascer, de acordo com a ordem de parição, em camundongos *BALB/c* e *Swiss*, alojado em ambiente enriquecido ou não.

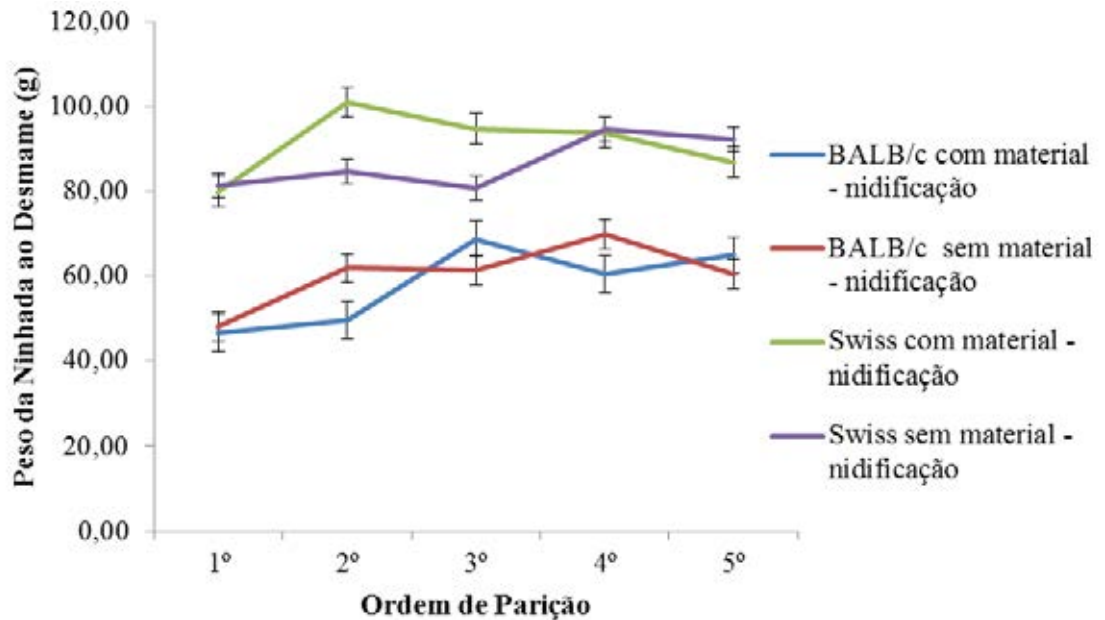


Figura 6. Peso da ninhada ao desmame, de acordo com a ordem de parição, em camundongos *BALB/c* e *Swiss*, alojado em ambiente enriquecido ou não.

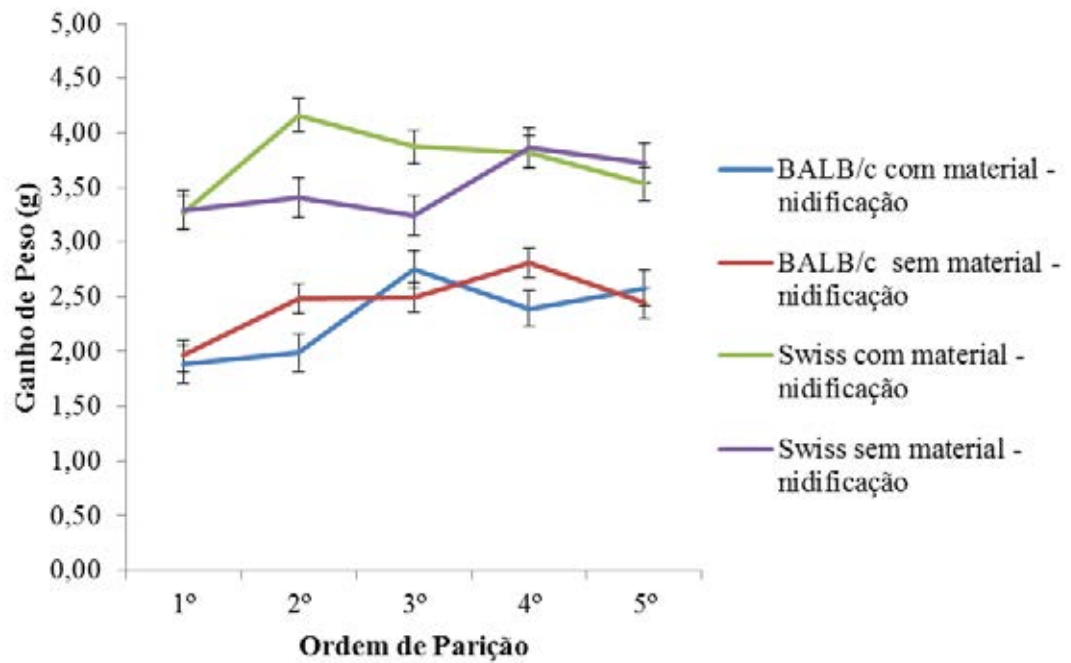


Figura 7. Ganho de peso, de acordo com a ordem de parição, em camundongos *BALB/c* e *Swiss*, alojado em ambiente enriquecido ou não.

Discussão

Experimento 1

Os camundongos interagiram com todos os materiais oferecidos como substrato para nidificação. Entre os quatro materiais a touca foi utilizada 75 vezes para a construção do ninho, seguida do rolinho usado 49 vezes, o algodão 35 vezes e a gaze utilizada 21 vezes.

Os materiais usados neste experimento foram escolhidos levando em conta as características físicas e comportamentais da espécie. Vários autores afirmam que um dos comportamentos mais característicos da espécie é a construção do ninho (VAN DE WEERD et al, 1997; ESKOLA e KALISTE - KORHONEN, 1998; SUCKOW et al, 2001; LATHAM et al, 2004). Na natureza os camundongos selvagens usam o ninho como abrigo contra predadores, para minimizar condições ambientais adversas e proteção da prole (LATHAM et al, 2004). Em camundongos de laboratório é facilmente observável que este comportamento persiste quando lhes é oferecido material para nidificação (GASKILL et al 2012).

O material de nidificação permite ao animal estruturar seu ambiente dando-lhes mais controle sobre suas condições de vida, o que pode significar maior grau de bem-estar (VAN DE WEERD ET AL, 1997; LOO, 2004). Segundo Van de Weerd et al (1996), o material para nidificação deve ser facilmente manipulável pelo animal para que funcione também como forma de entretenimento e atividade física, conferindo benefícios extras ao seu bem-estar.

Todos os elementos escolhidos para o teste são materiais com os quais os animais poderiam interagir moldando-os de acordo com a sua conveniência. No entanto, algumas características inerentes aos materiais podem ter influenciado na escolha dos animais. Optou-se por não oferecer a touca inteira devido a uma questão de segurança dos neonatos. Durante o experimento, percebeu-se que existia o risco dos recém-nascidos ficarem presos ao elástico da touca. Priorizando a segurança e bem-estar dos animais, optou-se por oferecer esse material em pedaços. Observou-se que conforme eles abriam os pedaços, cada um deles era ligado a outro formando uma estrutura em formato de toca que se assemelhava a touca inteira quando aberta.

O rolinho de papelão é facilmente moldado, mas se constitui, naturalmente, numa estrutura que permite que o animal o utilize como abrigo sem precisar rasgá-lo; também

pode ser usado como forração depois de picado pelo próprio animal e pode ser utilizado para “brincadeiras” estimulando o comportamento lúdico. O inconveniente observado foi relativo à dificuldade do animal em carregá-lo de uma caixa para outra, dentro do aparato utilizado no experimento, quando comparado aos demais materiais. Talvez por esse motivo ele não tenha sido mais utilizado na confecção do ninho ficando muitas vezes em caixas distintas a que abrigava o ninho, servindo aparentemente, como um local para brincadeiras e exercícios físicos.

O algodão e a gaze são materiais de fácil manuseio e com ampla possibilidade de interação. Diferentemente do rolinho, devido à estrutura, tamanho e peso o algodão e a gaze, assim como os pedaços de touca, podiam ser movimentados por todas as caixas que compunham o sistema, sem maiores dificuldades. Cabe ressaltar que o quesito facilidade quer seja no manuseio, quer seja no transporte do material, deve ser analisado cuidadosamente, pois o fato do animal escolher enfrentar maiores adversidades, ou optar pelo que é mais trabalhoso, pode ser considerado como um forte indicio de preferência. Segundo Broom (1988) sempre que os animais mostram que eles estão dispostos a trabalhar duro para alcançar uma opção oferecida, pode-se concluir que o seu bem-estar é melhorado ao atingir esse objetivo. Por outro lado, no caso do rolinho, pode ser que em função da disponibilidade de vários materiais e espaço físico, o animal tenha apresentado uma forte motivação para compartimentalizar suas atividades dividindo o local do ninho (descanso) e o local de atividades com brincadeiras, por exemplo, onde a interação ocorria apenas entre o macho e fêmea adultos. O rolinho era o único material que permitia atividade física intensa (entrada e saída, subida e descida, saltos) aos animais. Segundo Olsson e Dahlborn (2002) machos e fêmeas de camundongo são altamente motivados para a tarefa de construção de ninho, mesmo sem a presença de filhotes. De fato, machos e fêmeas realizaram a atividade de confecção do ninho. Este comportamento foi manifestado desde o início do experimento, ou seja, a partir dos 28 dias de idade quando foram acasalados. Nestes eventos foi perceptível o uso mais intenso dos materiais que permitiam a construção de estruturas que se assemelhavam a abrigos ou ocas (touca e rolinho), isto é, construções com paredes e cobertura arredondada enquanto os que se adequavam mais a forração misturando-se mais a maravalha tradicional, de raspa de madeira, foram menos utilizados (algodão e

gaze). Os ninhos observados eram basicamente de três formas: planos e sem paredes; com paredes baixas, mas sem cobertura ou com paredes mais altas e cobertura.

Próximo ao período de parição o comportamento de construção do ninho se intensificou com a produção de ninhos mais ricos com a mistura de mais tipos de materiais envolvidos na sua construção. Segundo Bridges (1997) e Brown (1998) este comportamento é esperado. Em camundongos, a construção do ninho é considerada uma importante etapa do comportamento materno, que se intensifica poucos dias antes do parto, e é modulada por fatores hormonais, neurais, genéticos e ambientais (Francis & Meaney, 1999; Champagne et al. 2003; Bonsignore et al., 2006). Neste período, é de se esperar que a fêmea se esmere na confecção do ninho e nos demais cuidados com a prole, pois trata-se de uma espécie altricial que necessita de intensos cuidados maternos nos primeiros dias de vida (Vieira, 2003).

A temperatura ambiente e o metabolismo característicos da espécie também podem ter sido fatores motivadores de suas escolhas. A temperatura tem efeito sobre a maior parte dos processos fisiológicos e comportamentais destes animais, tais como metabolismo, atividade motora, crescimento e desenvolvimento, consumo de água e alimentos, resposta imune e função cardiovascular (Gordon et al, 1998). A faixa de termoneutralidade para camundongos corresponde a uma variação entre 26°C e 30°C (Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, 2014). Dentro deste intervalo de temperatura ambiente a termorregulação ocorre sem a necessidade de aumentar a produção de calor metabólico ou de ativar os mecanismos de perda de calor por evaporação. Em ambientes que estejam fora dessa faixa de temperatura, os camundongos precisam ajustar sua fisiologia e comportamento, por exemplo, desempenhando atividades como a construção de ninhos, aumentando o consumo de alimento ou descansando. Cabe ressaltar que durante o experimento a temperatura ambiente foi mantida na faixa de 22 + 2°C o que pode ter influído na intensidade das atividades desempenhadas por estes animais.

Dentre os materiais testados concluiu-se que a touca seria o primeiro material “preferido” pelos animais, pois foi o material mais utilizado para a confecção de ninho, seguido pelo rolinho. Entretanto, devido a dificuldade no país em adquirir o rolinho, certificado, em grandes quantidades e a preços acessíveis aos biotérios de instituições nacionais, usou-se o terceiro material (algodão) mais encontrado na composição dos

ninhos em substituição ao segundo material, para as análises de produção do experimento 2.

Experimento 2

O número de partos por fêmea por linhagem não diferiu entre os tratamentos. O experimento foi encerrado quando 80% das fêmeas alcançaram o quinto parto. Optou-se pela análise dos cinco primeiros ciclos reprodutivos em virtude do declínio de produtividade das fêmeas de camundongo *BALB/c* ocorrer a partir do 6º parto, como demonstrado por MOREIRA et al, (2015). Como o estudo envolvia a comparação entre duas linhagens de padrão genético distintos, acompanhou-se o período de maior produtividade destes animais, ou seja, o experimento analisou cinco partições sucessivas, avaliando a produção e o comportamento destes animais do acasalamento aos 28 dias de idade até o desmame da ninhada do 5º parto.

Como esperado, a duração do experimento foi maior para a linhagem *BALB/c* com 254 dias de duração enquanto os camundongos *Swiss* precisaram de 232 dias para que 80% das fêmeas alcançassem o 5º ciclo reprodutivo. As fêmeas de camundongo atingem a maturidade sexual em cerca de 4 a 6 semanas de idade. As linhagens isogênicas apresentam a maturidade sexual mais tardiamente por volta de 6 semanas de idade, enquanto as heterogênicas são mais precoces alcançando a maturidade por volta de 4 semanas de idade (*GUIDELINES FOR BREEDING GENETICALLY ENGINEERED MICE*, 2004).

A linhagem influenciou a idade ao primeiro parto. As fêmeas de camundongos *Swiss* apresentaram idade ao primeiro parto aos 80,53 dias enquanto as fêmeas da linhagem isogênica *BALB/c*, mais tardias, tiveram o primeiro parto com 94,10 dias, uma diferença de aproximadamente 14 dias.

O intervalo de partos diferiu entre as linhagens, foi menor nos camundongos *Swiss* (29,08 dias) e maior para os *BALB/c* (33,31 dias). A análise conjunta destes resultados sugere que a linhagem heterogênica *Swiss* apresenta características genéticas mais favoráveis ao desempenho dos animais em relação à duração do ciclo reprodutivo. Atribui-se as diferenças relacionadas à capacidade reprodutiva entre as linhagens isogênicas e heterogênicas, à homozigose de alelos de genes recessivos advindos do emprego de acasalamentos consecutivos entre irmãos completos, para obtenção de um índice de homozigose de 99% (BENAVIDES E GUÉNET, 2003). Segundo Braga

(2010) este fenômeno é conhecido como depressão endogâmica e manifesta-se de forma mais branda nos camundongos que nos demais mamíferos. Afeta as primeiras gerações para depois se estabilizar. Assim, as linhagens que ultrapassam vinte gerações de acasalamentos consanguíneos mantendo a capacidade reprodutiva, mesmo que baixa, podem dar origem a linhagens consanguíneas com desempenho reprodutivo menor em relação às linhagens heterogênicas (BENAVIDES E GUÉNET, 2003; BRAGA, 2010).

Detectou-se efeito da interação entre a linhagem e a modificação ambiental sobre o peso médio ao nascer de forma que o fornecimento de dois tipos de material para nidificação aumentou o peso médio ao nascer na linhagem *BALB/c* e diminuiu a mesma característica na linhagem *Swiss*, sem alterar outras características como o tamanho da ninhada. Este resultado não era esperado. O fornecimento de material de nidificação é considerado um dos melhores métodos de enriquecimento para a espécie na medida em que traz mais benefícios aos roedores do que a adição de brinquedos ao ambiente (VAN DE WEERD e BAUMANS 1995; ESKOLA e KALISTE-KORHONEN, 1999; SUCKOW et al, 2001).

No entanto, a adoção de melhores práticas para habitação de camundongos de laboratório é muito mais complexa do que possa parecer e necessita ser cuidadosamente avaliada (WÜRBEL, 2001), principalmente quando estes animais estão submetidos a sistema intensivo de produção. As linhagens isogênicas geralmente apresentam ninhadas menores do que as heterogênicas. Existem variações até mesmo entre as linhagens puras (SILVER, 1995). O tamanho da ninhada depende do número de óvulos ovulados, qualidade do esperma e mortalidade pré-natal que, em linhagens isogênicas, pode variar entre 10 e 20% (*GUIDELINES FOR BREEDING GENETICALLY ENGINEERED MICE*, 2004). Segundo Berry (1970) o peso corpóreo da mãe também influencia o número de filhotes da ninhada, sendo que fêmeas maiores produzem mais óvulos (apud WEBER E OLSSON, 2008).

Os filhotes de ninhadas grandes são mais leves ao nascer se comparados aos de ninhadas pequenas (MENDL, 1988). De fato, as fêmeas lactantes de camundongos *Swiss* são maiores que as lactantes *BALB/c* e normalmente produzem ninhadas maiores com filhotes mais leves ao nascer. No experimento, a verificação do número de nascidos ocorria duas vezes ao dia (uma vez no período da manhã e outra no período da tarde), mas nem sempre era possível realizar a pesagem imediatamente após o parto. O

tempo transcorrido entre a hora do parto e a pesagem pode ter influenciado os resultados. Neste quadro, o ganho de peso da prole nas primeiras horas de vida antes da pesagem, pode ser considerado um fator de diferenciação entre as linhagens durante este período sob influência da modificação ambiental.

É aceito por vários autores (Francis e 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 Van de Weerd (1994) vários estudos demonstraram que as diferentes linhagens de camundongos apresentam reações comportamentais distintas frente à modificação ambiental. A hiperatividade e ansiedade dos camundongos da linhagem *BALB/c* frente à presença de substratos para construção do ninho promovem a interação imediata com os materiais e implicam na construção de ninhos mais elaborados e complexos que podem facilitar o emprego dos cuidados maternos imediatamente após o parto.

Assim, os resultados sugerem que os cuidados maternos, diretos e indiretos, imediatos e constantes prestados pelas mães da linhagem *BALB/c* podem ter contribuído para o peso dos seus filhotes nas primeiras horas de vida enquanto as lactantes da linhagem *Swiss* não foram tão eficientes no cuidado materno em ambiente modificado como as primeiras. Priestnall (1972) demonstrou que as fêmeas que pariram grandes ninhadas deixaram o ninho com mais frequência do que as que pariram pequenas ninhadas, dada à relação ninho e termorregulação, e, conseqüentemente, passaram menos tempo no desempenho dos cuidados maternos diretos, independentemente de alimento e água estarem disponível no ninho. Segundo Weber e Olsson (2008) há uma correlação negativa entre o tamanho da ninhada e o ganho de peso corporal dos filhotes no primeiro dia de vida. Pode ser que as lactantes *Swiss* que apresentaram ninhadas maiores tenham se ausentado do ninho por mais tempo que as *BALB/c*, diminuindo os cuidados maternos direcionados a prole naquele período.

O leite materno é a única fonte de alimentação para os neonatos e também pode ter contribuído para a diferença de peso, pois estudos sugerem que existem diferenças na composição do leite entre as diferentes linhagens. Shoji e Kato (2006) demonstraram que a composição do leite fornecido por mães *BALB/c* pode ter contribuído para o ganho de peso de suas crias. Segundo os autores foram encontradas diferenças em

concentrações de proteínas, lactose e lipídios no leite, mas não na quantidade de leite em estudo comparativo entre as linhagens isogênicas *BALB/c*, *C57BL/6*, e *DBA/2*.

Outra possibilidade para os resultados obtidos seria relacionada à atividade motora da fêmea no pré-parto. Para Weber e Olsson (2008) o envolvimento das mães na construção de ninhos pré-parto é um claro indicador de bem-estar. Enquanto o ninho claramente afeta a sobrevivência e bem-estar das crias, a possibilidade de satisfazer a motivação de construí-lo parece afetar o bem-estar das mães. Em roedores, o comportamento materno se inicia alguns dias antes do parto com a construção de ninhos mais elaborados (BRIDGES, 1996; BROWN, 1998), caracterizando um período de intensa atividade física.

Entre as linhagens observaram-se diferenças na intensidade de interação dos animais com os materiais disponíveis para a confecção dos ninhos, bem como em seus formatos, como esperado. Segundo Lee (1973) e Brain e Rajendram (1986) existe uma forte influência genética no comportamento de construção de ninho. Os acasalamentos seletivos e a manipulação genética produziram linhagens com características fenotípicas e genéticas distintas que implicam em diferenças na complexidade da construção dos ninhos e tocas (DUDEK et al, 1983; TARANTINO et al, 2000; BOND et al, 2002).

A linhagem *BALB/c*, desde o primeiro fornecimento dos materiais, independentemente de prenhez, interagiu rapidamente com eles construindo ninhos que se assemelhavam a ocas, isto é, ninhos com paredes altas e cobertura com muita forração no piso. Os *Swiss* não demonstraram interesse imediato pelos materiais, demoraram mais para interagir com eles e construíram ninhos mais baixos e espalhados. Para Brown et al (1999) as diferenças no comportamento maternal podem ser devido a diferenças nos níveis de atividade entre as linhagens. Os camundongos da linhagem *BALB/c* são caracterizados como animais naturalmente ansiosos (BOLEIJ, 2012) o que sugere que seu estado emocional seja um fator motivador para um contato físico mais rápido com os materiais quando comparado com a linhagem *Swiss*. A instabilidade emocional característica da linhagem *BALB/c* pode ter influenciado, também, o formato dos ninhos construídos. Ninhos fechados com estruturas de piso parede e teto funcionam como abrigo e podem fornecer refúgio para situações em que ocorram estímulos aversivos dentro ou fora da gaiola, implicando diretamente em sensação de

segurança por parte dos animais (WECHSLER, 1995; VAN DE WEERD 1995 e BAUMANS 1995; LOO, 2004).

A temperatura atua diretamente sobre os processos fisiológicos e comportamentais destes animais, conforme já abordado. Segundo Gaskill (2009) os camundongos escolhem temperaturas abaixo de 26°C nos períodos de atividade, que são mais intensas na fase de escuro, e temperaturas acima de 26°C nos períodos de descanso e manutenção, mais frequentemente observados durante a fase clara. Durante o experimento, as duas linhagens de camundongos foram mantidas a uma temperatura ambiente entre 20°C e 24°C, ou seja, abaixo da faixa preconizada como ideal. Os camundongos têm uma relação alta entre a área superficial e o volume corporal, o que significa que o calor é facilmente perdido por estes pequenos mamíferos (DAWSON, 1967; MCGARRY et al, 1976). Esta perda de calor é agravada em temperaturas mais baixas, exigindo que os animais aumentem a produção de calor ou reduzam a quantidade perdida (CANNON e NEDERGAARD, 2011), a fim de manter o equilíbrio térmico (apud GASKILL 2012). Neste cenário, a modificação ambiental, através do fornecimento de material de nidificação, parece ser fundamental para evitar o estresse térmico pelo frio e para a manutenção do bem-estar destes animais durante a gestação e lactação, possibilitando intensa atividade física.

A interação entre a linhagem e a ordem do parto influenciou o número de nascidos, desmamados e a taxa de mortalidade. Para a linhagem *BALB/c* houve um aumento contínuo no número de nascidos do primeiro até o quarto parto onde se verificou o pico de nascidos com ligeira queda no quinto parto. O número de desmamados acompanhou estes resultados do primeiro ao terceiro parto. No entanto, do terceiro para o quarto parto o número de desmamados não acompanhou o número de nascidos. 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 et al. (2009) afirmaram 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). Concluíram 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. Neste quadro, a fêmea pode apresentar condição corporal variável ao longo dos partos, influenciando no número de nascidos e desmamados.

Em contra partida, a linhagem *Swiss* apresentou comportamento semelhante à linhagem *BALB/c* do primeiro ao terceiro parto, sendo este o pico de nascidos. No entanto, nesta ordem de parição verificou-se queda no número de desmamados e um aumento abrupto da mortalidade pré-desmama. As linhagens *BALB/c* e *Swiss* apresentaram diferenças em relação à ordem de parto, com os melhores índices de nascidos e desmamados e comportamentos inversos em relação à taxa de mortalidade pré-desmama. Entretanto, nas duas linhagens verificou-se que a taxa de mortalidade aumentou à medida que aumentou o número de nascidos. Estes resultados podem estar ligados ao gasto energético dos pais no cuidado e amamentação da prole que é alto e pode influir diretamente na sobrevivência dos filhotes à medida que a ninhada aumenta.

Ressalta-se que não houve limite de ninhada para a linhagem *Swiss* o que talvez tenha influenciado nos resultados obtidos. Nos biotérios de produção é comum esta prática, no entanto este manejo pode implicar em mortalidade dos neonatos doados a outras fêmeas. Em roedores é comum que o infanticídio ocorra entre indivíduos não aparentados. Normalmente, as fêmeas são menos agressivas que os machos, mas durante a lactação podem atacar crias de outras fêmeas (FERRARI et al., 1996). Assim, optamos pelo estudo sem limite de ninhada a fim de avaliar a necessidade de implantação deste manejo.

Nesta espécie o comportamento parental é exercido por pais e mães. No entanto, as mães passam a maior parte do tempo cuidando das crias. Elas estão envolvidas na construção do ninho, amamentação, lambidas nas crias e manutenção da ninhada agrupada, atividades que demandam alto custo energético. A limpeza corporal das ninhadas demanda tempo e energia por parte das mães. Os filhotes de roedores, quando nascem, não possuem o reflexo de micção e defecação, cabe as mães através de lambidas nas regiões genito-urinária e anal estimular estes reflexos sem o qual eles não sobrevivem (EBISUI et al , 2009). É a mãe também quem exerce o cuidado de buscar os filhotes que saem do ninho, tarefa muito importante, pois o filhote fora do ninho perde calor muito rápido, o que compromete a sua sobrevivência. Segundo Gaskill (2012) esta

tarefa tem alto custo energético e, quando a mãe não realiza esse comportamento a contento pode ser devido à exaustão física ou impossibilidade de recuperar vários filhotes no mesmo período.

Além disso, em ninhadas maiores a mãe diminui o contato corporal com seus filhotes afastando-se do ninho em virtude da sua necessidade de termorregulação corporal. A temperatura dentro do ninho de uma fêmea lactante é em torno de 32°C, mantida a faixa padrão de temperatura em ambientes de criação de animais de laboratório 20°C a 24°C, (GASKILL, 2012). Assim, a diminuição do contato corporal com a ninhada diminui o tempo de amamentação e intensifica a competição entre os filhotes pelo acesso às melhores tetas. A soma desses fatores pode implicar na mortalidade dos filhotes mais fracos e menos aptos à sobrevivência em condições adversas (BERRY e BRONSON, 1992). Estas situações podem ocorrer nas duas linhagens, mas há incidência mais severa sobre os camundongos *Swiss*, na medida em que eles naturalmente apresentam ninhadas maiores.

Cabe ressaltar que a menor taxa de mortalidade para a linhagem *BALB/c* ocorreu no terceiro parto. O resultado sugere que este parto correspondeu ao auge reprodutivo da fêmea lactante, pois foi o período de menor mortalidade pré-desmama de todo o período analisado. A queda abrupta da mortalidade indica um aumento dos cuidados maternos e, provavelmente, melhor desempenho na lactação, a partir do segundo parto. Para a linhagem *Swiss* nota-se que o maior número de nascidos ocorreu no quinto parto o que sugere que estes animais provavelmente apresentem vida útil reprodutiva mais longa que os isogênicos *BALB/c* que apresentam viés de queda do quarto para o quinto parto.

Com relação às características relacionadas ao peso, detectou-se efeitos de interação tripla (linhagem, ordem de parição e enriquecimento) sobre o peso ao nascer e ao desmame e o ganho de peso do nascimento à desmama. Com relação à linhagem *BALB/c* há forte diferenciação no peso da ninhada ao nascer entre os grupos com ou sem modificação ambiental. A partir do segundo parto, houve a alternância entre uma ninhada mais leve e outra mais pesada até o quinto parto sendo que, para o grupo enriquecido, as ninhadas ímpares apresentaram o maior peso da ninhada ao nascer enquanto no grupo não enriquecido as ninhadas pares foram as que mostraram maior peso da ninhada ao nascer, entre os cinco partos estudados. A mesma distribuição dos

resultados ao longo das ordens de parição foi observado em relação ao peso da ninhada ao desmame e o ganho de peso do nascimento à desmama, sendo que o terceiro parto apresentou os maiores pesos para o grupo enriquecido em relação as três características. Para os camundongos isogênicos *BALB/c*, o terceiro parto se firma como o de melhor desempenho, aliando baixíssima mortalidade e bons índices de peso ao nascer e ao desmame para a prole. Conforme já abordado, as condições corporais da fêmea lactante influem diretamente no investimento materno para assegurar a sobrevivência e desenvolvimento adequado da cria.

Na linhagem *Swiss* verificou-se peso da ninhada maior ao nascer dos filhotes de fêmeas do grupo não enriquecido. A partir do segundo parto o quadro se inverte até o quarto parto, quando praticamente os valores se igualam e chega-se ao quinto parto com o resultado encontrado no primeiro parto. As distribuições do peso médio à desmama e do ganho de peso são muito parecidas quando comparadas as ordens de parição relacionadas ao peso médio ao nascer. Para os camundongos *Swiss*, o segundo parto se apresenta como o de melhor desempenho, aliando baixa mortalidade e bons índices de peso ao nascer e ao desmame da prole. Os resultados demonstraram que os partos com menor taxa de mortalidade pré-desmama são os mesmos que apresentaram o maior ganho de peso para a prole, tanto para a linhagem *BALB/c* quanto para a linhagem *Swiss*. Estes resultados sinalizam a relação entre a eficiência dos cuidados maternos sobre a prole e a produção de filhotes mais pesados ao nascer e ao desmame, diminuindo consideravelmente, a mortalidade nestas ordens de parição.

Conclusão

Os testes de preferência são importantes na avaliação comportamental da espécie e podem ser melhor explorados em estudos com objetivo de adotar técnicas de manejo que melhorem o bem-estar dos animais cativos, em sistema de produção intensivo. Dentre os materiais testados, houve preferência pelos que apresentavam características que permitiam aos animais a construção de ninhos com formatos de toca (ninhos com cobertura), como a touca de polipropileno e o rolinho de papelão seguidos pelo algodão e gaze, em ordem decrescente de preferência, materiais que se misturavam mais facilmente a maravalha e foram mais utilizados como forração dos ninhos juntamente a maravalha.

A linhagem influenciou todas as características de produção estudadas com exceção do peso médio a desmama e, como esperado, comprova-se que as diferenças genéticas devem ser levadas em consideração na definição das condições de habitação destes animais.

O uso de dois tipos de material para nidificação (touca de polipropileno e algodão) não diminuiu o desempenho reprodutivo dos animais. Esta modificação ambiental atuou apenas sobre o peso médio ao nascer, no entanto a diferença encontrada nesta característica, com influência negativa para a linhagem *Swiss* e positiva para a linhagem *BALB/c*, não repercutiu no peso médio a desmama na medida em que ambas as linhagens foram desmamadas com pesos semelhantes. Portanto, recomenda-se o fornecimento de pedaços de touca de polipropileno e algodão como material de nidificação, para as linhagens estudadas, com o objetivo de permitir que o animal manifeste os comportamentos característicos da espécie promovendo o bem-estar.

Com relação as características relacionadas ao peso, cabe ressaltar que o material de nidificação utilizado favoreceu o peso a desmama no segundo e terceiro parto na linhagem *Swiss* enquanto na linhagem *BALB/c* o peso a desmama foi maior sem o uso de material de nidificação no segundo e quarto partos. Estes resultados reforçam a importância do conhecimento das respostas dos animais de diferente genética frente a modificação ambiental, conforme citado anteriormente.

Destaca -se também a necessidade de adoção de técnicas de manejo, como o limite de ninhada, para os animais submetidos a acasalamentos monogâmicos em sistema intensivo de produção, uma vez que foi evidenciado o aumento da mortalidade pre-desmame nos partos com maior número de nascidos.

Referencias

- BAUMANS, V. The welfare of laboratory mice. In: Kaliste, E. (Ed.), **The Welfare of Laboratory Animals**. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2004. p. 119-152.
- BENAVIDES, F. J.; GUÉNET, J. L. **Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones**. Madrid: Universidad de Alcalá, SECAL y Laboratory Animals, 2003.
- BERRY, R. J. The natural history of the house mouse. **Field Stud.** v.3, p.219-262, 1970.
- BERRY, R. J., BRONSON, F. H. Life history and bioeconomy of the house mouse. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 67, p. 519-550, 1992.
- BOLEIJ, H.; SALOMONS, A.R.; VAN SPRUNDEL, M.; ARNDT S. S.; OHL, F. Not all mice are equal: welfare implications of behavioural habituation profiles in four 129 mouse substrains. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, e.42544, 2012.
- BOND, T. L. et al. Nest building in nulligravid, primigravid and primiparous C57BL/6J and DBA/2J mice (*Mus musculus*). **Physiology & Behavior**, v. 75, n. 4, p. 551-5, 2002.
- BONSIGNORE, L.T. et al. Acute perinatal asphyxia at birth has long-term effects on behavioural arousal and maternal behaviour in lactating rats. **Behavioural Brain Research**, v.172, p.54-62, 2006.
- BRAGA, L. M. G. M. O animal como um modelo experimental: noções básicas de genética, sanidade, alojamento e manutenção de animais de laboratório. In PITREZ, P. M. C.; FEIJÓ, A. G. S.; BRAGA, L. M. G. M. (Ed). **Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2010. p. 171-186.

BRAIN, P. F.; RAJENDRAM, E. A. Nest building in rodents: A brief cross-species review. In: Brain, P.F., Ramirez, J.M. (Eds.), **Cross-Disciplinary Studies on Aggression**. Publicaciones de la Universidad de Sevilla, p. 158-182, 1986.

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.

BROOM, D.M., 1988. The scientific assessment of animal welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 20, p. 5-19,1988.

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.

BROWN, R. E.; MATHIESON, B.; STAPLETON, J.; NEUMANN, P. E. Maternal behavior in female C57BL/6J and DBA/2J female mice. **Physiology & Behavior**. v. 67, p. 599-605, 1999.

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 & Behavior**, v. 79, n. 3, p. 359-371, 2003.

DAWSON, N.J. The surface area/body weight relationship in mice. **Australian Journal Biological Sciences** v. 20, p. 687-690, 1967.

DUDEK, B. C. et al. Genetic influences on digging behaviors in mice (*Mus musculus*) in laboratory and seminatural settings. **Journal of Comparative Psychology** v. 97, n. 3, p. 249-59, 1983.

EBISUI, L.; FONTES, R. S.; LAPCHIK, V. B. V. Rato. 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. 229-250.

ESKOLA, S.; KALISTE-KORHONEN, E. Aspen wood-wool is preferred as a resting place but does not affect intracage fighting of male BALB/c and C57BL/6J mice. **Laboratory Animal**, v. 33, p.108-121,1999.

FERRARI, P.F. et al. Comparing different forms of male and female aggression in wild and laboratory mice: an ethopharmacological study. **Physiology e Behavior**, v. 60, n. 2, p.549-553, 1996.FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. **Modelos Experimentais em pesquisa**. São Paulo: Acta Cirúrgica Brasileira. 2005.

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.

GASKILL, B. N. ; GORDON, C. J.; PAJOR, E. A.; LUCAS, J.R.; DAVIS, J.K.; GARNER, J. P.. Heat or insulation: behavioral titration of mouse preference for warmth or access to a nest. **PLoS One**, v. 7, e.32799, 2012.

GASKILL, B. N. ; ROHR, S. A; PAJOR E. A. ; LUCAS, J. R.; GARNER, J. P. Some like it hot: Mouse temperature preferences in laboratory housing. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 116, p. 279-285, 2009.

GODARD, A. L. B.; GUÉNET, J. L. Modelos animais de doenças humanas. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 9, p. 96-100, 1999.

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.

GORDON, C. J.; BECKER, P.; ALI, J. S. Behavioral thermoregulatory responses of single- and group-housed mice. **Physiology & Behavior**., v. 65, p. 255-262, 1998.

GUIA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO. Institute of Laboratory Animal Research , (Ed). **Ambiente, alojamento e manejo de animais**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2014. p. 45-68.

GUIDELINES FOR BREEDING GENETICALLY ENGINEERED MICE. 2004. Disponível em: <<http://www.med.nyu.edu/dlar/assets/breedinggeneticallyengineeredmice.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2014.

LATHAM, N.; MASON, G.. From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, p.261-289, 2004.

LEE, C.T. Development of nest-building behavior in inbred mice. **Journal of General Psychology**, v.87, p.13, 1972.

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.

MCGARRY, M. P.; BAHNY, L.; JIVIDEN, J.; WILLIAMS, P.; MIRAND, E. A.; MURPHY, G. P. Particulate matter induced periorbital abscess in gnotobiotic athymic nu/nu (nude) mice. **Laboratory Animals**, v. 26, p. 956-958, 1976.

MENDL, M.;. The effects of litter size variation on mother–offspring relationships and behavioural and physical development in several mammalian species (principally rodents). **Journal Zoology** v. 215, p. 15–34, 1988.

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.

OLSSON, I. A. S.; DAHLBORN, K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of environmental enrichment. **Laboratory Animal**, v.36, p. 243-270, 2002.

PRIESTNALL, R. Effects of litter size on the behaviour of lactating female mice (*Mus musculus*). **Animal Behaviour**, v. 20, p. 386-394, 1972.

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.

SHOJI, H.; KATO, K. Maternal behavior of primiparous females in inbred strains of mice: A detailed descriptive analysis. **Physiology & Behavior**, v. 89, p. 320-328, 2006.

SILVER, L.M., 1995. **Mouse Genetics: Concepts and Applications**. Oxford University Press, Oxford.

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.

SUCKOW, M.A.; DANNEMAN, P.; BRAYTON, C. *The Laboratory Mouse*. Boca Raton: CRC Press. 2001.

TARANTINO, L. M. et al. Behavior and mutagenesis screens: the importance of baseline analysis of inbred strains. **Mammalian Genome**, v. 11, n. 7, p. 555-64, 2000.

VAN DE WEERD, H.A.; BAUMANS, V.; KOOLHAAS, J. M.; VAN ZUTPHEN, L. F. Strainspecific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. **Journal of Experimental Animal Science**, v. 36, p.117-127, 1994.

VAN DE WEERD, H. A.; BAUMANS, V. Environmental enrichment in rodents. In: *Environmental Enrichment Information Resources for Laboratory Animals*. **AWIC Resource Series**, v. 2, p. 145-149, 1995.

VAN DE WEERD, H. A.; BROEK, F. A. R., BAUMANS, V.. Preference for different types of flooring in two rat strains. **Applied Animal Behaviour Science**, n. 46, p. 251-261, 1996.

VAN DE WEERD, H. A.; VAN LOO, P. L. P.; KOOLHAAS, J. M.; VAN ZUTPHEN, L. F. M.; BAUMANS, V. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. **Laboratory Animal**, v.3 1, p. 133-143, 1997.

VAN LOO, P. L. P.; VAN DE WEERD, H. A.; VAN ZUTPHEN, L. F. M.; BAUMANS, V. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. **Laboratory Animal**, v. 38, n. 2, p. 178-188, 2004.

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

WEBER, E. M.; OLSSON, I. A. S., 1–22. . Maternal behaviour in mus musculus sp: an ethological review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, p. 1-22, 2008.

WECHSLER, B. Coping and coping strategies: A behavioural view. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 43, p.123-134,1995.

WÜRBEL, H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. **Neurosciences**, v. 24, n. 4, p. 207-211, 2001.

CAPÍTULO 3

Comportamento parental de camundongos isogênicos e heterogênicos submetidos à modificação ambiental com o fornecimento de material para nidificação

Comportamento parental de camundongos isogênicos e heterogênicos submetidos à modificação ambiental com o fornecimento de material para nidificação.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência da modificação ambiental no comportamento parental de camundongos da linhagem *BALB/c* e *Swiss* em sistema de acasalamento intensivo monogâmico através da observação comportamental e teste de ansiedade em labirinto em cruz elevado. O experimento envolveu os primeiros cinco ciclos reprodutivos. Usou-se 60 casais de irmãos completos da linhagem *BALB/c* e 60 casais formados por acasalamentos aleatórios da linhagem *Swiss*. Os animais possuíam padrão sanitário controlado e foram criados e mantidos em ambiente padronizado. Eles foram distribuídos, num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2 (duas linhagens em alojamento com ou sem material para nidificação). Como forma de modificação ambiental foram utilizados os seguintes materiais: touca descartável de polipropileno cortada em oito pedaços de aproximadamente 1 cm cada e um pedaço de algodão de aproximadamente 3 g. Eles foram previamente embalados e autoclavados e fornecidos durante a troca de gaiola. Todos os casais foram avaliados quanto aos cuidados empregados com a prole no terceiro ciclo reprodutivo. As observações ocorriam 40 a 50 minutos após o início da troca das gaiolas (duas trocas/semana) durante todo o período de aleitamento (21 dias). Os comportamentos maternos registrados foram os ligados à amamentação: amamentando arqueada, reta e na posição lateral; cuidados diretos e indiretos com a ninhada: lamber a ninhada, descansar com os filhotes e construção do ninho; bem como comportamentos individuais: descansando sozinha, autolimpeza, ingestão de alimento e outros comportamentos. Dos machos foram registrados os mesmos comportamentos, com exceção dos que envolviam amamentação. Não houve efeito da interação linhagem x modificação do ambiente sobre os comportamentos maternos e paternos estudados. Houve efeito da linhagem sobre o comportamento materno ($P = 0,0404$) e paterno ($P = 0,0355$) de construção do ninho e sobre a frequência de amamentação na posição arqueada ($P = 0,0212$), enquanto o material de nidificação não influenciou sozinho nenhum dos comportamentos maternos avaliados. O fornecimento de material para nidificação aumentou a frequência do comportamento paterno de descansar com os filhotes ($P = 0,0110$) e reduziu a de

descansar sozinho ($P = 0,0067$). Dez fêmeas lactantes de cada combinação linhagem/tratamento foram submetidas ao teste do labirinto em cruz elevado durante o quinto ciclo reprodutivo. O estado fisiológico (vazia ou prenhe) das fêmeas no momento do teste foi determinado. Não houve efeito da interação linhagem x modificação ambiental sobre as características estudadas no labirinto em cruz elevado. A linhagem influenciou todas as características estudadas, enquanto a modificação ambiental atuou apenas sobre o tempo de permanência esquadrinhando ($P = 0,0410$) aumentando-o. Detectou-se efeito da interação linhagem x condição fisiológica da fêmea ($P = 0,0351$) sobre o tempo de permanência no braço fechado do labirinto em cruz elevado. Os resultados sugerem que a modificação ambiental afeta o comportamento parental dos animais e que as diferenças genéticas devem ser levadas em consideração na definição das condições de habitação destes animais.

Palavras chave: Bem-estar, Ansiedade, Linhagens, Labirinto em cruz elevado, Material de nidificação.

Parental behavior of inbred mice and heterogenic submitted to environmental change with the supply of material for nesting.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of an environmental modification on the parental behavior of *BALB/c* and *Swiss* mice in an intensive monogamous system through behavioral observation and the anxiety test on the elevated plus maze. The experiment involved the first five reproductive cycles. Sixty full-sib pairs from the *BALB/c* line and 60 random mated Swiss pairs were used. The animals had a controlled sanitary status and were raised and maintained in a standardized environment. They were assigned to a completely randomized design in a 2 x 2 factorial arrangement (two lines and housed either with or without an environmental modification). A disposable cap cut in eight pieces of approximately 1 cm each plus a cotton piece of approximately 3 g were jointly used as environmental modification. They were previously wrapped and autoclaved and made available to the animals at each cage change (twice a week). The parental pairs were observed regarding offspring caring in the third reproductive cycle. The observations were carried out 40 to 50 minutes after the beginning of cage changing during the entire lactation period (21 days). Maternal behaviors related to nursing: arched-back nursing, blanket nursing, and supine nursing, and to direct and indirect litter care: licking the body, resting with the litter and nest building were recorded. Individual behaviors such as resting alone, self-grooming, eating and other behaviors were also recorded. The same pattern was used for the recording of paternal behaviors, except for nursing. No effect of the line x environmental modification interaction was found on the maternal and paternal behaviors. Line affected maternal ($P = 0.0404$) and paternal ($P = 0.0355$) nest building and nursing in the arched-back position ($P = 0.0212$), whereas the nesting material alone did not influence any of the maternal behaviors. The presence of nesting material increased the frequency of paternal behavior of resting with the litter ($P = 0.0110$) and decreased the frequency of resting alone ($P = 0.0067$). Ten lactating females from each line/ treatment combination were submitted to the elevated plus maze during the fifth reproductive cycle. Their physiological status (pregnant or non-pregnant) was determined afterwards. No effect of the line x environmental modification interaction was found on the traits evaluated in

the elevated plus maze. Line affected all traits whereas environmental modification affected the time scanning ($P = 0.0410$). A line x physiological status of the female interaction effect ($P = 0.0351$) was detected on the time spent in the closed arm. The results suggest that the environmental modification affect parental behavior and that the genetic differences should be taken into account in the definition of housing conditions for these animals.

Key words: Welfare, Anxiety, Strains, Elevated plus maze, Nesting material.

1. Introdução

A crescente preocupação dos bioteristas em implantar o Princípio dos 3 Rs (Substituição, Redução e Refinamento), nos biotérios de produção nacionais tem promovido grande número de pesquisas sobre o efeito da modificação ambiental no comportamento de camundongos. Para modificar o ambiente com possibilidade de benefícios aos animais é necessário o conhecimento do repertório comportamental da espécie em vida livre (GONYOU, 1993).

Dentre os comportamentos exibidos pelos camundongos, os de construção do ninho e de alojamento em tocas são apontados em vários estudos como os mais característicos da espécie (ALCOCK, 1993; GALLEF, 1993; SUCKOW et al., 2001). No entanto, os acasalamentos seletivos e a manipulação genética geraram linhagens com características fenotípicas e genéticas distintas, que promoveram gradações em alguns destes comportamentos, como por exemplo, diferenças na complexidade da construção dos ninhos e tocas para as linhagens isogênicas BALB/c, C57BL/6 e DBA (DUDEK et al., 1983; TARANTINO et al., 2000; BOND et al., 2002).

Nos biotérios de produção, as fêmeas utilizam o material disponível na gaiola para a confecção do ninho. Este é um comportamento que contribui para manter constante a temperatura corporal das crias (BARNETT et al., 1975), além de intensificar o contato mãe-filhote, facilitando o emprego dos cuidados maternos através do agrupamento dos filhotes no ninho (FLEMING et al., 1999). Para Weber e Olsson (2008) o envolvimento das mães na construção de ninhos pré-parto é um claro indicador de bem-estar. Enquanto o ninho, claramente, afeta a sobrevivência e bem-estar das crias, a possibilidade de satisfazer a motivação de construí-lo parece afetar o bem-estar das mães.

Em camundongos, o sistema de acasalamento permanente predomina, o que implica na presença permanente do pai na gaiola. No entanto, a divisão dos cuidados parentais não é clara. O comportamento paterno é pouco estudado em relação ao comportamento maternal, em parte devido à amamentação, período em que as mães são as únicas responsáveis pela alimentação da prole, o que faz com que fiquem muito mais tempo em contato com a ninhada que os pais.

Neste cenário, a avaliação criteriosa do comportamento parental é essencial para a implantação de técnicas de manejos eficazes que promovam o bem-estar aos animais cativos e melhorem efetivamente as condições de habitação deles.

A adoção da modificação ambiental, com o fornecimento de material para nidificação, pode ser considerada como um refinamento na prática de criação de animais de laboratório e pode ser considerada como uma importante etapa da implantação dos princípios dos “3 Rs” em Biotérios. Assim, as mudanças ambientais para fêmeas em produção devem ser conduzidas pelos bioteristas com enfoque no bem-estar animal, buscando paralelamente, o aumento da produção e levando em consideração as diferenças fenotípicas, genéticas e comportamentais exibidas pela variada gama de linhagens produzidas e mantidas atualmente nos biotérios de produção de camundongos.

O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência da modificação ambiental no comportamento materno e paterno de camundongos isogênicos da linhagem *BALB/c* e da linhagem heterogênica *Swiss* em sistema de acasalamento intensivo monogâmico através da avaliação comportamental e teste de ansiedade em labirinto em cruz elevado.

Material e Métodos

2.1. Condições gerais de ambiente e manejo

O experimento foi realizado na Área de Produção de Camundongos Isogênicos e Heterogênicos do Biotério Central do Instituto Butantan – SP – Brasil. As salas dos animais apresentavam fluxo de pessoas e insumos definidos e eram protegidas com barreiras sanitárias (autoclave de barreira, sistema de filtração de ar e diferencial de pressão). A temperatura ambiente era controlada em $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com 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:12E). Todo o sistema era ligado a um gerador, que garantia sua manutenção em caso de falta de energia elétrica.

Os modelos biológicos utilizados foram o camundongo isogênico *BALB/c* e o de linhagem heterogênica *Swiss*, ambos oriundos do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais tinham padrão sanitário controlado e foram mantidos em gaiolas de policarbonato com dimensões de 30x20x13cm (Beira-mar[®], São Paulo), que permitiam livre acesso à água potável e à ração balanceada. 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 (Quimtia[®], Curitiba), 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 às recomendações do *National Research Council* (1995). Todos os procedimentos obedeceram às 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 103/2012.

2.2. Comportamento Parental

Protocolo experimental

Neste experimento, foram utilizados 60 casais de irmãos completos da linhagem *BALB/c* (isogênica) e 60 casais formados por acasalamentos aleatórios da linhagem *Swiss* (heterogênica) distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2 (duas linhagens e alojamento com ou sem material para nidificação). Esta formação foi mantida, desde o acasalamento aos 28 dias até o encerramento do experimento, que correspondeu a 254 dias para a linhagem *BALB/c* e 232 dias para a linhagem *Swiss*. O experimento foi encerrado quando 80% das fêmeas completaram o quinto ciclo reprodutivo (desmame da ninhada).

Os animais utilizados para formação dos casais eram todos da mesma idade, mas provenientes de diferentes ninhadas. Receberam como material para nidificação 8 pedaços de toucas descartáveis de polipropileno cortadas em pedaços de aproximadamente 1 cm e algodão em pedaços de aproximadamente 3 g esterilizados e introduzidos na gaiola a cada troca, ou seja, duas vezes por semana. Os animais utilizados para formação dos grupos com nidificação foram provenientes de parentais que também receberam touca e algodão como forma de modificação ambiental. Ou seja, pertenciam a ninhadas que permaneceram desde o nascimento até o desmame em ambiente modificado, diferentemente dos animais formadores do grupo sem nidificação, que permaneceram durante o mesmo período em gaiolas que continham apenas cama de maravalha.

Para manter a isogenicidade da linhagem *BALB/c*, os acasalamentos foram realizados entre irmãos completos, da mesma ninhada. 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. Neste mesmo dia foram sorteados, aleatoriamente, 60 machos e 60 fêmeas (irmãos), que foram acasalados imediatamente. Os sorteios ocorreram tanto em relação à formação dos grupos (com ou sem material de nidificação), quanto em relação à posição das gaiolas nas estantes. Repetiu-se o mesmo processo para a linhagem *Swiss* observando-se a heterogenia característica desses animais. Desta forma, os acasalamentos foram aleatórios evitando-se o acasalamento de animais aparentados.

Todos os casais foram mantidos em sistema monogâmico intensivo, até completarem cinco ciclos reprodutivos consecutivos. Não houve descarte de animais ao nascer para limitar as ninhadas, todos os filhotes nascidos vivos permaneceram nas gaiolas.

Todos os casais foram avaliados com relação aos cuidados empregados com a prole no 3º ciclo reprodutivo, com exceção dos que não chegaram ao terceiro ciclo, durante o período de duração do experimento. Para a linhagem *BALB/c* registrou – se o comportamento de 26 casais sem material de nidificação e 28 casais que receberam material de nidificação, enquanto na linhagem *Swiss* foram observados 25 casais de cada grupo. As observações ocorreram 40 a 50 minutos após o início da troca das gaiolas, portanto duas vezes por semana, durante todo o período de aleitamento (21 dias), ou seja, em seis dias diferentes. Os machos foram marcados com pincel atômico da cor vermelha para facilitar a diferenciação visual das lactantes. Os comportamentos materno e paterno foram registrados em planilhas a cada 10 segundos durante 10 minutos (60 registros) por dois observadores pelo método de varredura. Para as mães foram marcados os comportamentos ligados à amamentação: amamentando arqueada (AA), reta (AR) e na posição lateral (AL); cuidados diretos e indiretos com a ninhada: lambendo a ninhada (LN), descansando com os filhotes (DF) e construção do ninho (CN); bem como comportamentos individuais: descansando sozinha (DS), autolimpeza (AU), ingestão de alimento (IA) e outros comportamentos (OU). Dos machos eram registrados os mesmos comportamentos com exceção dos que envolviam amamentação. Outros comportamentos englobavam comportamentos como: escalar a tampa da gaiola, morder a tampa da gaiola, macho perseguindo a fêmea para cópula, macho e fêmea se cheirando, forrageando e em pé (CALDJI et al., 2000; CHAMPAGNE et al., 2003). As médias dos registros das seis observações por gaiola foram computadas e usadas nas análises estatísticas.

2.3. Análise Estatística

As variáveis comportamentais foram testadas quanto à premissa de distribuição normal com o auxílio do procedimento UNIVARIATE do SAS (2003). Foi constatado que a maior parte delas se desviou da distribuição normal. Então foi adotado um modelo log-linear e distribuição de Poisson (Kaps e Lamberson, 2004) e as análises foram implementadas com o auxílio do procedimento GENMOD do SAS (2003). Os modelos

incluiram os efeitos fixos de linhagem, de modificação ambiental e da interação entre esses efeitos, além do erro aleatório. As médias ajustadas foram contrastadas e consideradas diferentes quando $P < 0,05$.

2.4. Teste de Ansiedade – Labirinto em Cruz Elevado

Protocolo experimental

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo proposto para mensurar o medo e a ansiedade, baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos. Inicialmente, foi desenvolvido para ratos por PELLOW et al (1985) e posteriormente foi adaptado e validado para camundongos (LISTER, 1987).

O labirinto em cruz elevado utilizado neste experimento, consistia em um equipamento de madeira composto de dois braços abertos opostos de 30 x 5 cm e dois braços fechados (30x5x15 cm) também opostos dispostos em forma de cruz, elevados a 50 cm do solo. Os braços abertos e fechados eram conectados por uma plataforma central de 5x5 cm.

Dos 120 casais empregados no experimento de produção e comportamento foram sorteadas dez lactantes de cada combinação de linhagem x material de nidificação (N=40) para serem submetidas ao teste do labirinto em cruz elevado. As fêmeas foram identificadas e, posteriormente, foi registrado seu estado fisiológico (prenhas ou vazias).

O teste consistiu em colocar cada fêmea no centro do labirinto, com a cabeça direcionada para um dos braços fechados e permitir que o animal explorasse livremente todo o equipamento durante cinco minutos. Entre um animal e outro era realizada a assepsia do aparato com papel toalha e álcool 70%.

Foram consideradas as seguintes medidas comportamentais para análise: número de entrada nos braços abertos e fechados, sendo que considerava-se uma entrada em um dos braços do labirinto apenas quando as quatro patas do camundongo atravessavam o limite daquele braço; tempo de permanência nos braços abertos e fechados do labirinto, tempo de permanência no centro do labirinto, tempo de esquadrinhamento (projeção da cabeça sobre as laterais dos braços abertos do labirinto, examinando em qualquer direção, principalmente com mergulhos de cabeça e ombros em direção ao chão), tempo de espreitamento (saída do animal parcialmente de um braço fechado, somente com a cabeça e as patas dianteiras, avaliando os arredores).

Os registros foram realizados por duas pessoas, previamente treinadas, com o auxílio de um cronometro e anotados em planilhas.

2.5 Análise Estatística

As variáveis comportamentais relativas ao labirinto em cruz elevado foram testadas quanto à premissa de distribuição normal com o auxílio do procedimento UNIVARIATE do SAS (2003). Foi constatado que a maior parte delas se desviou da distribuição normal. Então foi adotado um modelo log-linear e distribuição de Poisson (Kaps e Lamberson, 2004) e as análises foram implementadas com o auxílio do procedimento GENMOD do SAS (2003). Os modelos incluíram os efeitos fixos de linhagem, de modificação ambiental e da interação entre esses efeitos, além do erro aleatório. As médias ajustadas foram contrastadas e consideradas diferentes quando $P < 0,05$.

Resultados

Comportamento parental

Não houve efeito da interação linhagem x modificação do ambiente sobre os comportamentos maternos e paternos estudados.

Houve efeito da linhagem sobre o comportamento materno de construção do ninho e a posição de amamentação arqueada, enquanto o material de nidificação não influenciou sozinho nenhum dos comportamentos avaliados (Tabela 1). Não houve efeito da linhagem sobre os demais comportamentos maternos.

Os camundongos *Swiss* fêmeas foram observados mais vezes construindo ninho do que os *BALB/c*. A posição de amamentação arqueada foi verificada em maior frequência nos *Swiss* do que nos camundongos *BALB/c*.

Tabela 1- Efeito da linhagem e do material de nidificação sobre o comportamento materno no terceiro ciclo reprodutivo de camundongos *BALB/c* e *Swiss* (número médio de registros).

Comportamento Materno	Linhagem		Valor de P	Material nidificação		Valor de P
	<i>BALB/c</i>	<i>Swiss</i>		Sim	Não	
Construção do Ninho	4,5 ± 2,1	9,1 ± 2,1	0,0404	8,2 ± 2,1	5,5 ± 2,1	0,3131
Amamentando Arqueada	69,9 ± 7,4	95,5 ± 7,7	0,0212	79,7 ± 7,5	85,7 ± 7,6	0,3940
Amamentando Reta	92,7 ± 9,6	107,3 ± 9,9	0,3490	103,6 ± 9,7	96,3 ± 9,8	0,5036
Amamentando Lateral	53,4 ± 7,8	29,1 ± 1,0	0,7843	55,3 ± 7,9	54,8 ± 8,0	0,8274
Lambendo	14,8 ± 1,9	13,6 ± 2,0	0,6481	17,2 ± 1,9	11,2 ± 1,9	0,0503
Descansando Filhotes	87,9 ± 10,9	85,9 ± 11,3	0,9331	94,6 ± 11,0	79,3 ± 11,2	0,4854
Descansando Sozinha	32,5 ± 6,8	43,0 ± 6,9	0,1963	39,6 ± 6,7	36,0 ± 6,9	0,7110
Autolimpeza	22,3 ± 2,8	22,1 ± 2,9	0,9806	21,0 ± 2,9	23,4 ± 2,9	0,6362
Ingestão Alimento	92,8 ± 9,1	76,9 ± 9,5	0,1709	80,6 ± 9,2	89,1 ± 9,4	0,4433
Outros Comportamentos	131,0 ± 9,4	104,9 ± 9,8	0,0705	111,7 ± 9,5	124,2 ± 9,7	0,5218

Detectou-se efeito da linhagem sobre o comportamento paterno de construção do ninho, enquanto houve efeito do fornecimento de material para nidificação sobre os comportamentos paternos de descansar com os filhotes e sozinho (Tabela 2).

Os machos da linhagem *Swiss* foram flagrados mais vezes envolvidos em comportamentos de construção do ninho que os *BALB/c*.

Em relação ao efeito do fornecimento de material para nidificação, os machos alojados em ambiente modificado foram observados descansando com os filhotes com maior frequência do que os machos alojados em ambiente sem modificação. Já o número de observações de descanso individual foi maior para os machos alojados sem material de nidificação do que para os machos alojados em gaiolas com ambiente modificado.

Tabela 2 – Efeito da linhagem e do material de nidificação sobre o comportamento paterno no terceiro ciclo reprodutivo de camundongos *BALB/c* e *Swiss* (número médio de registros).

Comportamento Paterno	Linhagem		Valor de P		Material nidificação		Valor de P
	<i>BALB/c</i>	<i>Swiss</i>	Sim	Não	Sim	Não	
Construção do Ninho	3,1 ± 1,4	8,1 ± 1,5	0,0355	0,0355	5,2 ± 1,4	6,1 ± 1,5	0,5082
Lambendo	8,5 ± 2,2	11,6 ± 2,3	0,2328	0,2328	11,1 ± 2,7	9,0 ± 2,3	1,4817
Descansando Filhotes	208,5 ± 14,9	222,5 ± 15,5	0,6949	0,6949	247,5 ± 15,1	183,6 ± 15,3	0,0110
Descansando Sozinho	75,8 ± 10,8	92,0 ± 11,2	0,2697	0,2697	62,5 ± 10,9	105,3 ± 11,1	0,0067
Autolimpeza	25,8 ± 3,6	24,3 ± 3,7	0,8686	0,8686	20,9 ± 3,6	29,2 ± 3,7	0,1056
Ingestão Alimento	51,6 ± 6,6	52,6 ± 6,8	0,8002	0,8002	52,3 ± 6,6	51,9 ± 6,8	0,8461
Outros Comportamentos	215,0 ± 12,5	184,4 ± 13,0	0,0938	0,0938	195,5 ± 12,6	203,9 ± 12,8	0,7329

Teste de Ansiedade – Labirinto em Cruz Elevado

Não houve efeito da interação linhagem x modificação ambiental sobre as características avaliadas no labirinto em cruz elevado. A linhagem influenciou todas as características estudadas, enquanto a modificação ambiental atuou apenas sobre o tempo de permanência esquadrinhando (Tabela 3).

O número de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto foi maior para os camundongos da linhagem *Swiss* e menor para a linhagem *BALB/c*.

Houve efeito da linhagem sobre o tempo de permanência dos camundongos no centro do labirinto, sendo que os *Swiss* permaneceram mais tempo neste local do que os *BALB/c*. O tempo de permanência nos braços abertos foi maior para a linhagem *Swiss* do que para a *BALB/c*. Em contra partida os camundongos da linhagem *BALB/c* permaneceram por mais tempo nos braços fechados que os da linhagem *Swiss* nestes mesmos braços do labirinto. O tempo de permanência espreitando também foi maior para os camundongos *BALB/c* do que para os camundongos *Swiss*.

Detectou-se também efeito da linhagem sobre o tempo de esquadrinhamento. A linhagem *Swiss* permaneceu mais tempo realizando este comportamento.

Com relação à modificação ambiental, os camundongos que receberam material de nidificação permaneceram por mais tempo esquadrinhando que os animais que não receberam este material.

Tabela 3 – Comportamento de fêmeas de camundongo *BALB/c* e *Swiss* que receberam ou não material de nidificação durante os cinco primeiros ciclos reprodutivos no labirinto em cruz elevado.

	Linhagem		Material de nidificação		Valor de P
	<i>BALB/c</i>	<i>Swiss</i>	Sim	Não	
Comportamento Materno					
Número de entradas nos braços abertos	0,6 ± 0,5	4,3 ± 0,5	2,3 ± 0,5	2,62 ± 0,50	0,2339
Número de entradas nos braços fechados	2,8 ± 0,4	8,0 ± 0,4	5,6 ± 0,4	5,27 ± 0,41	0,5913
Tempo de permanência no centro (s)	30,9 ± 4,2	52,9 ± 4,4	44,3 ± 4,4	39,5 ± 4,3	0,3331
Tempo de permanência no braço aberto (s)	4,2 ± 6,9	62,0 ± 7,2	34,0 ± 7,2	32,1 ± 7,0	0,5367
Tempo de permanência no braço fechado (s)	197,8 ± 10,1	155,2 ± 10,5	171,8 ± 10,4	181,2 ± 10,2	0,7059
Tempo de permanência esquadrinhando (s)	3,9 ± 1,9	11,6 ± 2,0	10,9 ± 1,98	4,6 ± 1,9	0,0411
Tempo de permanência espreitando (s)	60,9 ± 6,1	17,9 ± 6,3	36,18 ± 6,28	42,6 ± 6,1	0,4507

Detectou-se efeito da interação linhagem x condição fisiológica da fêmea ($P = 0,0351$) sobre o tempo de permanência no braço fechado do Labirinto em Cruz Elevado. As fêmeas *Balb/c* vazias permaneceram mais tempo no braço fechado do que as prenhes, já no caso das fêmeas *Swiss* não houve esta diferença entre os estados fisiológicos.

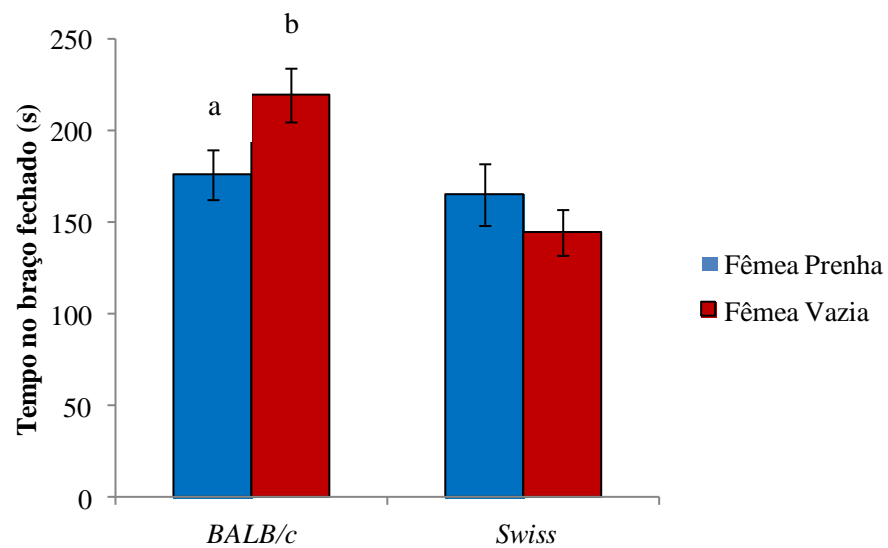


Figura 1 – Efeito da interação linhagem x condição fisiológica da fêmea ($P = 0,0351$) sobre o tempo de permanência no braço fechado do Labirinto em Cruz Elevado.

Discussão

Comportamento Parental

Foram observados e registrados os comportamentos parentais exibidos pelos camundongos isogênicos e heterogênicos durante o terceiro ciclo reprodutivo.

Optou-se por este ciclo por existir um consenso entre os bioteristas de que o terceiro ciclo reprodutivo é o melhor para os camundongos de linhagens heterogênicas, por se considerar que neste período, as matrizes estão no auge de seu desenvolvimento físico e reprodutivo com potencial para produzir filhotes mais saudáveis e com melhor ganho de peso. Muitos biotérios adotam o manejo de reposição de reprodutores heterogênicos baseados nesta premissa e reservam os animais oriundos do terceiro ciclo reprodutivo para reposição. Desta forma, era esperado que os cuidados parentais fossem mais intensos neste ciclo e que as observações executadas durante este período refletissem esses comportamentos.

No entanto, quando se observa os dados de produção dos camundongos *Swiss* (Moreira, 2015), nota-se que este ciclo reprodutivo apresentou o maior índice de mortalidade pré - desmama e menor peso da ninhada à desmama quando comparado ao segundo ciclo reprodutivo.

Nas observações realizadas durante todo o período de aleitamento, ou seja, 21 dias, do nascimento ao desmame dos filhotes do terceiro ciclo reprodutivo, foi evidenciado a participação do casal na confecção do ninho. Segundo Olsson e Dahlborn (2002) machos e fêmeas de camundongo são altamente motivados para a tarefa de construção de ninho, mesmo sem a presença de filhotes e, de fato, tanto os machos quanto as fêmeas foram observados realizando esta atividade durante todo o período de avaliação do terceiro ciclo.

Alguns autores definem que todo cuidado dispensado às crias, tanto por parte das fêmeas como dos machos, é chamado de comportamento parental e visa aumentar as chances de sobrevivência dos filhotes e suas aptidões para a vida adulta (EBSUI et al., 2009; VIEIRA, 2003). O camundongo é uma espécie altricial e necessita de intensos cuidados para a sobrevivência dos filhotes. Em função disso, muitas vezes, o cuidado parental é confundido com o materno, pois é a mãe quem se ocupa da alimentação das crias que nascem totalmente dependentes. Nos biotérios de produção, o sistema de acasalamento permanente predomina o que implica na presença permanente do pai na

gaiola. No entanto, a divisão dos cuidados parentais não é clara. Comparativamente, os machos permanecem menos tempo em contato com os filhotes que as lactantes e talvez por isso sejam menos observados em atitudes de cuidadores, mas isso não significa que eles não participem dos cuidados com a prole. Embora o comportamento paterno também seja importante, ele tem recebido pouca atenção da comunidade científica quando comparados à quantidade de pesquisas sobre o comportamento materno.

Segundo Bonsignore (2006) o comportamento materno é descrito como uma sequência de comportamentos tais como postura de amamentação, lambidas nas crias, construção e manutenção do ninho, manutenção da ninhada agrupada e defesa contra intrusos ou agressores. Estes comportamentos seriam modulados por fatores hormonais, neurológicos, características genéticas e estímulos sensoriais das crias.

Além dos fatores hormonais, os estímulos provenientes dos filhotes são decisivos para a modulação do comportamento materno, enquanto a experiência de cópula e a coabitação com a fêmea prenha em acasalamentos monogâmicos são importantes para a modulação do comportamento paterno (VIEIRA 2003). Talvez por isso, o número de observações de comportamentos de construção de ninho tenha sido próximo entre machos e fêmeas de cada uma das linhagens. As fêmeas da linhagem *BALB/c* apresentaram 4,5 registros enquanto os machos 3,1. Os camundongos *Swiss* fêmeas foram observados 9,1 vezes neste comportamento para 8,1 vezes nos machos.

Entre as linhagens observaram-se diferenças na intensidade de interação entre os animais e os materiais disponíveis para a confecção dos ninhos, bem como em seus formatos. Segundo Lee (1973) e Brain e Rajendram (1986) existe forte influência genética no comportamento de construção de ninho e embora os resultados desta pesquisa apontem os camundongos *Swiss* como mais interessados e executores do comportamento de confecção do ninho, os camundongos *BALB/c* confeccionaram ninhos mais ricos e com formatos mais elaborados. Isto se deve ao fato de que os registros dos comportamentos ocorriam em torno de 40 a 50 minutos após a troca de gaiola. Neste intervalo de tempo os *BALB/c* já estavam com seus ninhos praticamente prontos, enquanto os camundongos *Swiss* ainda estavam iniciando a sua confecção e por isso obtiveram registro maior deste comportamento.

Segundo Van de Weerd et al. (1994) vários estudos demonstraram que as diferentes linhagens de camundongos apresentam reações comportamentais distintas

frente à modificação ambiental. A hiperatividade e ansiedade característicos dos camundongos da linhagem *BALB/c* frente à presença de substratos para construção do ninho, parecem promover a interação imediata com os materiais e levar à construção mais rápida dos ninhos.

A linhagem também influenciou a postura de amamentação. Dentro do conjunto de cuidados maternos com a prole, a amamentação é, sem dúvida, um dos itens de maior importância para a sobrevivência da espécie. Após o parto, a fêmea permanece por vários períodos deitada sobre os filhotes para aquecê-los.

As posturas de amamentação mais frequentemente observadas em camundongos são: arqueada, reta (com o dorso muito pouco arqueado) ou deitada de lado (CALDJI et al., 2000; CHAMPAGNE et al., 2003).

Neste estudo, observamos que a frequência da postura de amamentar foi maior na posição reta seguida da posição arqueada e lateral em ordem decrescente, para as duas linhagens estudadas. A diferença entre as linhagens se deu em relação a postura de amamentar arqueada com 69,9 observações nos camundongos *BALB/c* e 95,5 observações na linhagem *Swiss*. A postura reta e lateral ou deitada de lado (postura passiva em relação à prole mais observada em ninhada com mais dias de vida) são pouco descritas em literatura ao contrário da posição arqueada. Segundo Stern e Johnson (1990) quando a fêmea fica arqueada e se curva sobre os filhotes permite maior exposição dos mamilos o que facilitaria a sucção pelos filhotes e ejeção do leite. Talvez esta facilidade de sucção e ejeção do leite possa ser considerada um dos fatores responsáveis pelo desempenho em crescimento dos filhotes na medida em que as fêmeas *Swiss* desmamaram ninhadas maiores com pesos individuais semelhantes aos das ninhadas *BALB/c* que são menores. Além disso, a postura arqueada parece ser mais confortável para amamentação de ninhadas grandes.

A modificação ambiental influenciou apenas o comportamento dos machos em relação ao descanso individual e com os filhotes. O material de nidificação fez com que os machos permanecessem mais tempo no ninho em contato com os filhotes do que sozinhos, como observado no grupo alojado sem material de nidificação. Nas gaiolas com material de nidificação foi possível observar contato mais intenso entre o macho, os filhotes e as lactantes. Os cuidados paternos com a prole como compartilhar o ninho com a fêmea e filhotes, deitar-se sobre os filhotes nos primeiros dias de vida,

participando da termorregulação da ninhada ou simplesmente deitar-se junto à ninhada foram comportamentos evidenciados durante as observações.

Segundo Weber e Olsson (2008) a existência do ninho, bem como a possibilidade de construí-lo, parecem trazer a esses animais uma condição de bem-estar. Estes fatores somados a temperatura mais alta dentro dos ninhos pode ter estimulado o macho a permanecer por mais tempo descansando com os filhotes no ninho.

A presença do macho no ninho com os filhotes parece ter gerado uma divisão de “tarefas” com a fêmea, de forma que a dinâmica familiar pode ter sido alterada. Para Wynne-Edwards (1998) a regulação térmica da ninhada pelo macho interfere na hipertermia da lactante devido à amamentação. Assim, o macho pode beneficiar a fêmea e sua relação com os filhotes, na medida em que ela poderá ausentar-se mais do ninho para desenvolver outras atividades, reduzindo o tempo em que está exposta a altas temperaturas, enquanto sua ninhada continuará recebendo os cuidados provenientes do macho.

Embora não tenham sido verificados desdobramentos positivos em outras características comportamentais como lambe os filhotes, autolimpeza, ingestão de alimentos e outros comportamentos, bem como de produção, com maior peso à desmama e número de desmamados, por exemplo, provavelmente em condições adversas de temperatura e disponibilidade de alimento essa alteração da dinâmica familiar repercutisse de maneira incisiva.

Não se detectou influência da linhagem ou da modificação ambiental sobre os demais comportamentos estudados. Cabe ressaltar que o resultado obtido pelas fêmeas alojadas em ambiente com modificação ambiental, em relação ao comportamento de lambe a ninhada, foi muito próximo à significância. As lactantes mantidas em ambiente modificado lambe mais suas crias que as lactantes mantidas em ambiente sem material de nidificação.

O ato de lambe os filhotes é um estímulo tátil de extrema importância para a sobrevivência da ninhada. Através deste comportamento, a fêmea lambe todo o corpo do animal principalmente a região anogenital estimulando a secreção dos filhotes (EBSUI et al., 2009). Dentre os efeitos positivos, as lambidas podem melhorar o desenvolvimento do cérebro (VAN OERS et al., 1999) e atuar na regulação do sistema endócrino dos filhotes (LEVINE, 2001). Outro ponto a ser considerado é que,

diferentemente da relação que se estabelece entre lactante e filhote durante o ato de amamentação, o comportamento de lambar a ninhada não depende do filhote e representa a motivação da lactante em relação à ninhada. Assim, alguns autores indicam a frequência deste comportamento como parâmetro para ser usado na mensuração do comportamento materno (LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

Os resultados obtidos para a ingestão de alimentos, autolimpeza e outros comportamentos foram semelhantes entre os grupos e linhagens estudados.

Teste de Ansiedade – Labirinto em Cruz Elevado

Detectou-se efeito da linhagem sobre todos os comportamentos estudados no labirinto em cruz elevado.

Os camundongos *BALB/c* passaram mais tempo nos braços fechados e espreitando, em comparação aos camundongos *Swiss* que entraram mais vezes nos braços fechados e abertos do labirinto e permaneceram por mais tempo nos braços abertos, no centro e esquadrinhando.

Frente a situações estressantes, as emoções mais comuns que podem repercutir nos animais são o medo e a ansiedade. Segundo LeDoux (1998), quando há o sentimento de risco iminente da integridade física, temos o medo; quando a avaliação for de perigo potencial, a emoção predominante é de ansiedade. O labirinto em cruz elevado é usado para aferir a ansiedade de roedores expostos a estímulos naturalmente aversivos, como a exposição a espaços abertos, avaliando suas reações naturais de defesa, ou seja, ele indica como o animal reage num determinado momento ao agente estressor. Assim, é importante ressaltar que os comportamentos de defesa estão relacionados à ansiedade em animais expostos ao modelo de labirinto em cruz elevado.

Observou-se que as lactantes da linhagem *BALB/c*, que expressam naturalmente maior grau de ansiedade e medo que outras linhagens (BOLEIJ et al., 2012) apresentaram menor atividade motora denotando baixa atividade exploratória (LISTER, 1987; FILE, 1999). Nestes testes, é de se esperar que os roedores evitem os braços abertos, permanecendo mais tempo nos braços fechados (TREIT et al., 1993) conforme verificado na linhagem *BALB/c*. O comportamento de espreitar também foi verificado com maior intensidade nestes camundongos, o que indica comportamento de maior ansiedade.

Em contra partida, as lactantes da linhagem *Swiss* demonstraram maior exploração das áreas aversivas (braços abertos) do labirinto, inclusive com o comportamento de esquadrihar mostrando claramente sua adaptação ao agente estressor, explorando-o (TREIT et al., 1993), o que indica um comportamento comparativamente menos ansioso que a linhagem *BALB/c*. Segundo Blanchard et al. (1997) os movimentos exploratórios cautelosos utilizando posturas do corpo, como o esquadrihamento possibilita a aproximação e a avaliação da possível ameaça. Esta diferença entre as linhagens pode ser devido à heterogeneidade característica da linhagem *Swiss* cuja variabilidade genética em decorrência dos acasalamentos aleatórios é bem alta.

A modificação do ambiente afetou o comportamento de esquadrihar o que indica que as lactantes que receberam material de nidificação tiveram postura de exploração e avaliação dos riscos, como esperado, o que caracteriza menos ansiedade. A literatura é contraditória em relação à influência do ambiente modificado no comportamento exploratório de roedores devido à complexidade e variedade dos tipos de enriquecimento utilizados. No entanto, alguns estudos sugerem que 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 (KLEIN et al., 1994; MENCH, 1998).

Assim, as informações obtidas pelos animais através de comportamentos exploratórios, como esquadrihar no labirinto em cruz elevado, podem influenciar o animal a decidir sobre que comportamento adotar em determinado momento. Alguns autores afirmam ainda que a organização do comportamento exploratório é mais diversificada e complexa nos animais criados em ambiente modificado, o que caracterizaria um comportamento exploratório mais exacerbado, inclusive com maior exposição a predadores (KLEIN et al., 1994; FERNÁNDEZ-TERUEL et al., 2002). No entanto, a modificação ambiental com o fornecimento de material de nidificação não teve influência sobre os demais comportamentos relacionados à menor ansiedade como o tempo de permanência nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados e abertos do labirinto.

Detectou-se efeito da interação entre a linhagem e a condição fisiológica da fêmea sobre o tempo de permanência no braço fechado do labirinto em cruz elevado. As fêmeas vazias permaneceram mais tempo no braço fechado do que as fêmeas prenhas da

linhagem *BALB/c*. Na linhagem *Swiss* não foram observadas diferenças entre os grupos. O resultado encontrado na linhagem *BALB/c* não era esperado. Todas as lactantes submetidas ao teste possuíam ninhadas com 16 a 18 dias de idade, ou seja, estavam próximas ao período de desmame. Este detalhe é importante, pois minimiza o estresse provocado pela separação da ninhada e evita danos físicos e psicológicos aos filhotes.

É de se esperar que as fêmeas prenhas sejam mais sensibilizadas pelas alterações neuro endócrinas que acontecem neste período do que às fêmeas em final de lactação. Ressalta-se que devido ao cio pós-parto as fêmeas prenhas estavam próximas da parição o que as tornaria mais sensíveis e ansiosas. Portanto, as gestantes deveriam se preservar e conseqüentemente permanecer por mais tempo nos braços fechados e não o contrário como foi observado. Por outro lado, as fêmeas gestantes podem ter sido motivadas pelo instinto de sobrevivência e proteção da futura prole a explorar os braços abertos buscando a preservação de sua cria.

Conclusão

A modificação ambiental com o fornecimento de material de nidificação (touca descartável de polipropileno e pedaços de algodão), influenciou o comportamento paterno aumentando o contato do macho com a ninhada. Ele permaneceu por mais tempo no ninho descansando com a ninhada, evidenciando os cuidados diretos empregados sobre a prole, como aquecer a ninhada, nas duas linhagens estudadas.

A modificação ambiental atuou também sobre o comportamento de esquadrihar aumentando o tempo que as fêmeas lactantes permaneceram desempenhando este comportamento. Tal resultado demonstra que a modificação ambiental utilizada diminuiu a ansiedade dos animais testados no labirinto em cruz elevado.

Diante destes resultados, a viabilidade de fornecimento do material de nidificação testado deve ser avaliada pelos bioteristas e implementada para as linhagens estudadas em sistema monogâmico e intensivo de produção.

A linhagem teve efeito sobre todos os comportamentos relacionados ao teste de ansiedade em labirinto em cruz elevado em fêmeas lactantes demonstrando que as diferenças genéticas influem no comportamento e devem ser consideradas na definição das condições de habitação destes animais.

Os resultados obtidos caracterizam a linhagem *BALB/c* como mais ansiosa quando comparada a linhagem *Swiss* e apontam para a necessidade de conhecer os diferentes estados emocionais característicos de cada uma delas, que podem influenciar os resultados das pesquisas, alterando-os.

A interação entre o estado fisiológico de fêmeas lactantes (prenhas ou vazias) e a linhagem e sua influência sobre o comportamento, quando submetidas ao teste de ansiedade em labirinto em cruz elevado, precisa ser melhor compreendido para correta avaliação do estado emocional destes animais em produção.

Referências

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

BARNETT, S. A.; MUNRO; K. M. H.; SMART, J. L.; STODDART, R.C. House mice bred for many generations in 2 environments. **Journal Zoology.**, v. 177, p. 153–169,1975.

BLANCHARD, R. J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J. A.; BLANCHARD, D. C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews.** 21, 783 – 789. 1997.

BOLEIJ, H.; SALOMONS, A.R.; VAN SPRUNDEL, M.; ARNDT S. S.; OHL, F. Not all mice are equal: welfare implications of behavioural habituation profiles in four 129 mouse substrains. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, e.42544, 2012.

BOND, T. L. et al. Nest building in nulligravid, primigravid and primiparous C57BL/6J and DBA/2J mice (*Mus musculus*). **Physiology Behavior**, v. 75, n. 4, p. 551-5, 2002.

BONSIGNORE, L.T. et al. Acute perinatal asphyxia at birth has long-term effects on behavioural arousal and maternal behaviour in lactating rats. **Behavioural Brain Research**, v.172, p.54-62, 2006.

BRAIN, P. F; RAJENDRAM, E. A. *Nest building in rodents: A brief cross-species review*. In: Brain, P.F., Ramirez, J.M. (Eds.), *Cross-Disciplinary Studies on Aggression*. Publicaciones de la Universidad de Sevilla, p. 158-182, 1986.

CALDJI, C.; DIORIO, J.; MEANEY, M. J. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. **Biological psychiatry**, v. 48, n. 12, p. 1164- 1174, 2000.

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.

DUDEK, B. C. et al. Genetic influences on digging behaviors in mice (*Mus musculus*) in laboratory and seminatural settings. **Journal of Comparative Psychology**, v. 97, n. 3, p. 249-59, 1983.

EBISUI, L.; FONTES, R. S.; LAPCHIK, V. B. V. Rato. 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. 229-250.

ESKOLA, S.; KALISTE-KORHONEN, E. Aspen wood-wool is preferred as a resting place but does not affect intracage fighting of male BALB/c and C57BL/6J mice. **Laboratory Animal**, v. 33, p.108-121,1999.

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.

FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E.; GALLANT, R. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 312 – 320. 1999.

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.

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

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.

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.

LATHAM, N.; MASON, G.. From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, p.261-289, 2004.

LEDOUX, J. Fear and the brain: Where have we been and where are we going. **Biology Psychiatry**, v. 44, p. 1229-1238, 1998.

LEE, C.T. Development of nest-building behavior in inbred mice. **Journal of General Psychology**, v.87, p.13, 1972.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 3, p. 255-260, 2001.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**. v. 92, p. 180-185, 1987.

LONSTEIN, J. S.; VRIES, G. J. Sex differences in the parental behavior of rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, p.669-686, 2000.

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.

OLSSON, I. A. S.; DAHLBORN, K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of environmental enrichment. **Laboratory Animal**, v.36, p. 243-270, 2002.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal Neuroscience Methods**, v. 14. p. 149-167, 1985.

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

STERN, J.M.; JOHNSON, S. K. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. **Physiology & Behavior**, v.47, n. 5, p. 993-1011, 1990.

SUCKOW, M.A.; DANNEMAN, P.; BRAYTON, C. *The Laboratory Mouse*. Boca Raton: CRC Press. 2001.

TARANTINO, L. M. et al. Behavior and mutagenesis screens: the importance of baseline analysis of inbred strains. **Mammalian Genome**, v. 11, n. 7, p. 555-64, 2000.

TREIT, D; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry Behavioral**, v. 44, p. 463-469, p. 1993.

VAN DE WEERD, H.A.; BAUMANS, V.; KOOLHAAS, J. M.; VAN ZUTPHEN, L. F. Strainspecific behavioural response to environmental enrichment in themouse. **Journal of Experimental Animal Science**, v. 36, p.117-127, 1994.

VAN DE WEERD, H. A.; VAN LOO, P. L. P.; KOOLHAAS, J. M.; VAN ZUTPHEN, L. F. M.; BAUMANS, V. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. **Laboratory Animal**, v.3 1, p. 133-143, 1997.

VAN OERS, H. J.; DE KLOET, E.R.; LEVINE, S. Persistent effects of maternal deprivation on HPA regulation can be reversed by feeding and stroking but not by dexamethasone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, n. 8, p. 581-588, 1999.

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

WYNNE – EDWARDS, K. E. Evolution of parental care in *Phodopus* : conflict between adaptations for survival and adaptations for rapid reproduction. **American Zoologist** , v. 38, p. 228-250, 1998.

CAPÍTULO 4

Implicações

A Ciência de animais de laboratório evoluiu enormemente nas últimas décadas. A grande quantidade de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios nacionais de produção ilustra este fato. Hoje produzimos animais com padrão genético e sanitário adequado à pesquisa e aos processos de produção de fármacos e imunobiológicos e obedecemos à legislação que normatiza a criação e experimentação animal. Mas não bastam instalações mais modernas e boas práticas de fabricação, é preciso conhecer as etapas de produção, o animal e seus processos biológicos, bem como o seu comportamento.

Cada vez mais as pesquisas indicam que as diferenças genéticas existentes entre as linhagens podem influenciar o comportamento dos animais e suas respostas quando em uso na experimentação. Comprometidos em produzir e manter estes animais em condições de bem-estar os pesquisadores (usuários e mantenedores) tem buscado formas de minimizar a condição de cativeiro dos animais sob seus cuidados.

Os resultados obtidos neste experimento indicam que os testes de preferência, podem contribuir para uma avaliação mais criteriosa do estado de bem-estar do animal na medida em que sejam consideradas também suas motivações. A implantação de técnicas de manejo, que não ignorem as escolhas ou preferências e motivações, podem auxiliar na busca por um estado de bem-estar permanente.

A modificação ambiental influenciou o comportamento parental e evidenciou os cuidados diretos e indiretos empregados sobre a prole. Os resultados sugerem que o comportamento paterno é mais ativo em ambiente modificado com o fornecimento de material para nidificação. Este aspecto deve ser considerado, na definição das condições de habitação para estes animais.

A linhagem influenciou todas as características de produção estudadas e a diferença encontrada no peso ao nascer, devido a modificação ambiental, com influencia negativa para a linhagem *Swiss* e positiva para a linhagem *BALB/c* sinaliza fortemente para a necessidade de estudos criteriosos que abordem parâmetros de produção e comportamento entre as diferentes linhagens antes da padronização de um novo ambiente nos alojamentos de camundongos.

Tão importante quanto o conhecimento científico acerca do manejo reprodutivo, é o reconhecimento da senciência desses animais e a utilização de técnicas de

modificação ambiental, que permitam ao animal manifestar os comportamentos característicos da espécie, minimizando a provável condição de estresse em cativeiro e ainda melhorar os índices de produção.